

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene der
der Veterinärmedizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H.-J. Sinell

Immunologische Untersuchungen an einigen
wasserlöslichen Muskeleiweißen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

vorgelegt von
Ursula Barten
Tierärztin aus Vetschau

Berlin 1965
Journal-Nr. 517



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550805_0048

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene der
der Veterinärmedizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H.-J. Sinell

Immunologische Untersuchungen an einigen
wasserlöslichen Muskeleiweißen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

vorgelegt von
Ursula Barten
Tierärztin aus Vetschau

Berlin 1965
Journal-Nr. 517

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Prof. Dr. J. Boch
Referent:	Prof. Dr. H.-J. Sinell
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. h.c. M. Lerche

Tag der Promotion: 23. Juli 1965

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	3
II. <u>Schrifttum</u>	4
1. Herstellung von Antigenen und Antiseren zur biologischen Eiweißdifferenzierung	4
a) Serumantigen	5
b) Nativer Fleischsaft	5
c) Hitzegefälltes Eiweiß	6
d) Alkoholgefälltes Eiweiß	6
e) Systematik der Muskeleiweiße	7
f) Methoden zur Trennung von Proteingemischen	9
2. Immunisierungsverfahren	12
3. Präzipitationsmethoden	14
a) Präzipitation im Röhrchen	14
b) Präzipitation im Agargel	15
III. <u>Eigene Untersuchungen</u>	23
1. Material und Methoden	23
Antigene	
a) Vorversuche mit Serum	23
b) Myogen A nach Baranowski	23
c) Wasserlösliche, native Muskeleiweiße mit Ammoniumsulfat gefällt	24
d) Wasserlösliche, native Muskeleiweiße durch Gelfiltration gewonnen	25
e) Alkoholgefälltes Muskelantigen	26
2. Immunisierungen	26
3. Präzipitationen	28
a) Im Röhrchen nach UHLENHUTH	28
b) Im Agargel nach OUCHTERLONY	29
c) Immunoelektrophorese	30
4. Ergebnisse	32
a) Vollserum	32
b) Kristallines Rinderserumalbumin	37
c) Ammoniumsulfatgefällte Muskeleiweißfraktionen	40
d) Wasserlösliche, native, gelfiltrierte Muskeleiweiße	43

IV. <u>Diskussion</u>	
1. Zur Fraktionierung nativer, wasserlöslicher Muskelproteine	51
2. Immunisierungserfolge bei verschiedenen Injektionsmodi	52
3. Zu den Präzipitationsmethoden	53
4. Identifizierung der nativen, wasserlöslichen Muskeleiweiße aus den eigenen Versuchen	55
V. <u>Schlußfolgerung</u>	59
VI. <u>Zusammenfassung</u>	61
VII. <u>Literaturverzeichnis</u>	63



I. Einleitung

Für die Lebensmittelüberwachung ist der Nachweis der Species-Identität von Fleisch und Fleischwaren von großem Interesse. Histologische Untersuchungen sind zur Feststellung der Artspezifität nur in Ausnahmefällen brauchbar. Auch chemisch-analytische Bestimmungen führen im Rahmen dieser Fragestellung nur selten zu verwertbaren Ergebnissen.

Die größte Bedeutung hat nach wie vor der serologische Nachweis, bei dem unter Verwendung spezifischer, präzipitierender Antiseren die Identifizierung von Proteinen auf biologischem Wege erfolgt. Im allgemeinen werden derartige Antiseren durch Immunisierung mit Blutserum gewonnen. Andere Gewebseiweiße, insbesondere Muskel-eiweiß, sind zu diesem Zwecke im Rahmen der Lebensmitteluntersuchung nur ganz vereinzelt eingesetzt worden. Deshalb ist über die immunologischen Eigenschaften dieser Proteine bis heute wenig bekannt.

Die vorliegende Arbeit soll daher nur zum Grundsätzlichen dieser Fragen beitragen. Die Möglichkeit einer praktischen Anwendung stand dabei vorerst noch im Hintergrund.

II. S c h r i f t t u m

1. Herstellung von Antigenen und Antiseren zur biologischen Eiweißdifferenzierung

Durch Immunisierung von Kaninchen gegen die verschiedenen Tierarten lassen sich spezifische Antiseren gewinnen. Mit ihnen gelingt der Nachweis der Artspezifität.

Paul UHLENHUTH (1901) führte diese biologische Eiweißdifferenzierung mittels präzipitierender Antiseren zu Beginn unseres Jahrhunderts ein. Eine sichere Isolierung und Identifizierung verschiedener Eiweißarten ein und desselben Tieres - mit Hilfe spezifisch präzipitierender Antiseren - war allerdings wegen gemeinsamer Rezeptorengruppen nicht möglich, zumal die chemischen Methoden zur Reindarstellung der Antigene noch unvollkommen waren (UHLENHUTH u. WEIDANZ, 1905).

Bei der Herstellung von Antiseren kann man - wie UHLENHUTH u. SEIFFERT (1930) berichteten - bis zu 50 % mit einem Fehlergebnis rechnen, d.h. Spezifität und Titer entsprechen nicht den Erwartungen. MANTEUFEL u. BEGER (1921) beobachteten, daß die Spezifität mit der Immunisierungsdauer abnahm, und führten unspezifische Reaktionen darauf zurück, daß die Präzipitation eine Gattungsreaktion sei und so das Mitreagieren aller Tiere innerhalb der Gattung erkläre. (s.auch ROULET u. Mitarb., 1960, S.19). Ein niedriger, unspezifischer Titer war bei quantitativem Arbeiten, d.h. bei Anlegen von Verdünnungsreihen, zu vernachlässigen (FRIEDBERGER u. COLLIER, 1919).

Unsicherheiten können sich daraus ergeben, daß die spezifisch wirksamen Stoffe des Antigenmaterials und die entstehenden Reaktionsprodukte chemisch nicht genau bekannt und nicht rein darstellbar sind. Versuchstier und Antigen sind nicht immer gleich, und die Folgen äußerer oder innerer Einflüsse können bei einer Immunisierung zu den verschiedensten Effekten führen (UHLENHUTH u. SEIFFERT, 1930). Der Erfolg serologischer Untersuchungen ist jedoch abhängig von der Qualität, d.h. von der Spezifität und dem Titer der Antiseren. Neue, bessere Möglichkeiten, diese Probleme zu

bearbeiten, ergaben sich durch die großen Fortschritte, die die Proteinchemie erzielte.

a) Serumantigen

Von UHLENHUTH (1901) wurden präzipitierende Antiseren zur Untersuchung von Fleisch im allgemeinen mit Blutserum als Antigen hergestellt. Er ging dabei von dem Gedanken aus, daß sich auch in gut ausgeblutetem Fleisch eine genügend große Menge Serum befindet, und man daher auch dann eine positive Reaktion erhält, wenn man Fleischauszüge mit dem homologen Anti-Serum-Serum präzipitiert (1 g Skelettmuskulatur enthält nach ordnungsgemäßem Schlachten noch 10 ul Blut; HANSARD, 1956).

Dagegen beschrieben MANTEUFEL u. TOMIOKA (1924), daß eine Anzahl von Anti-Serum-Seren trotz guter Titer gegenüber Blutseren mit dem entsprechenden Muskelfleisch kaum, unspezifisch oder gar nicht reagierten. Es ist nach ihrer Ansicht vorstellbar, daß auch Muskeleiweiße immunologisch aktiv sind.

b) Nativer Fleischsaft

NÖTEL (1902) und RUPPIN (1902) immunisierten Kaninchen mit nativem Muskelpreßsaft. RUPPIN (1902) behauptete, durch Injektionen von Fleischauszügen auf bequeme Weise ein höchstwirksames Antiserum zu erhalten. Bei anderen Untersuchern waren die Bemühungen, mit dieser Methode hochwertige Anti-Muskeleiweiß-Seren zu gewinnen, erfolglos (W.A.SCHMIDT, 1907). Man erhielt nur sehr schwach wirksame Antiseren und betonte vor allem die außerordentlich schlechte Verträglichkeit und mangelhafte Haltbarkeit der wässrigen Fleischauszüge, die man als Antigen benutzen mußte. Heterologe Trübungen traten bei der Präzipitation vermehrt auf. Die Unverträglichkeit der nativen Muskelpreßsäfte wurde von DOLD (1911) auf eine "primäre Organgiftigkeit" derselben zurückgeführt. Andererseits entstanden bei der Immunisierung große Schwierigkeiten durch störende Nebenreaktionen bei

den Versuchstieren, z.B. starke Abmagerung, Abszesse und anaphylaktische Schockerscheinungen. Die Antiseren waren nicht spezifisch.

c) Hitzegefälltes Eiweiß

FUDJIWARA (1922) sowie MANTEUFEL u. TOMIOKA (1924) versuchten, die Verträglichkeit nativer Muskelpreßsäfte zu verbessern, indem sie das Eiweiß durch Erhitzen ausfällten. Auf diesem Wege erhielten sie Antiseren von guter Qualität, sahen aber häufig Thrombosen in den Ohrenrandvenen wegen der Beschaffenheit des Antigens und hatten dadurch hohe Verluste an Versuchstieren. Sie forderten trotzdem, bei der Herstellung präzipitierender Antiseren zur Fleischuntersuchung auf keinen Fall Blutserum, sondern Fleischauszüge als Antigen zu verwenden. Nach ihren Feststellungen reagierten Anti-Fleisch-Seren auch mit Blutserum, Anti-Serum-Seren jedoch oft schlecht mit den entsprechenden Fleischauszügen. Verwendete man hitzegefälltes Serum als Antigen (W.A.SCHMIDT, 1912), erhielt man ebenfalls wirksame Antiseren, die zur Fleischuntersuchung aber nicht besser als native Anti-Serum-Seren geeignet waren.

Die Versuche, mit hitzegefälltem Muskeleiweiß zu immunisieren, wurden von ROSENBERG (1928) weitergeführt, die mit dieser Methode spezifische Antiseren herstellen konnte. Untersuchungen von SINELL (1961) sollten klären, ob hitzedenaturierte Muskeleiweiße überhaupt noch eine spezifisch antigene Wirkung haben, und ob sich daraus noch serologisch aktive Substanzen gewinnen lassen.

d) Alkoholgefälltes Eiweiß

Eine andere Möglichkeit, verträgliche Antigene aus Fleisch zu gewinnen, ist die Ausfällung des Eiweißes durch Alkohol. Ein derartiges Verfahren beschrieben

TSUKASAKI (1922) und ebenfalls MANTEUFEL u. TOMIOKA (1924). Mit gutem Erfolg verwendeten sie zur Immunisierung alkoholgefälltes Antigen. Es traten weniger Kreuzreaktionen als bei der Verwendung von Blutserum und Muskelpreßsäften auf, und alkoholgefälltes Eiweiß schien auch in seiner immunologischen Wirkung dem, hitzekoagulierten überlegen zu sein.

Wie aus der Literatur hervorgeht (W.A.SCHMIDT, 1903), waren die bisher erwähnten Methoden noch nicht voll befriedigend. Sie wurden der Aufgabe, ein Antiserum mit hohem spezifischen Titer gegen Muskeleiweiße herzustellen, nur unvollkommen gerecht. Diese Ansicht gilt auch heute noch, und über die immunologische Aktivität der Muskeleiweißkörper liegen nur wenige Untersuchungen vor. Das beruht zum Teil darauf, daß Serum- und Muskeleiweiß sehr kompliziert zusammengesetzte Kolloidsysteme darstellen, die nur schwer trennbar sind und außerhalb ihres natürlichen Verbandes die vorsichtigste Behandlung erfordern.

e) Systematik der Muskeleiweiße

Die Systematik und Nomenklatur der Muskeleiweißkörper ist noch sehr unvollständig und nicht immer einheitlich (SALOBIR, 1958). Die gebräuchlichste Einteilung ist die nach ihren physiologisch-chemischen Eigenschaften und ihrer Lokalisation im Muskel (BOSCH, 1951). Diese Systematik geht auf Untersuchungen von MEYER u. WEBER (1933) zurück, die nach Extrahierbarkeit und Löslichkeit unterscheiden:

wasserlösliche Muskeleiweiße:	Myogen Myoalbumin Myoglobin
wasserunlösliche Muskeleiweiße:	Globulin Myosingruppe Tropomyosin Peptomyosin N-Protein Y-Protein und Stroma.

Die Bezeichnungen Myogen und Myosin stammen aber schon von v.FÜRTH, der 1895 aus Muskelpreßsaft ein Albumin isolierte, das er Myogen nannte und den Namen Myosin für das kontraktile Protein des Muskels vorschlug.

Anders teilte GRAU (1960) die Muskeleiweißkörper ein, und zwar unterschied er nur lösliche und unlösliche Eiweiße und zählte zu den löslichen das wasserlösliche, albuminartige Myogen und das in Salzlösung lösliche Globulin X.

Für die Myogenfraktion (20% des Gesamtmuskeleiweißes) gibt es in der Literatur zwei Einteilungen. Das Myogen nach WEBER (Molekulargewicht 81000) und das Myogen A und B nach BARANOWSKI (WEBER u. STÖVER, 1933). SMITH (1951) isolierte aus Myogenlösungen noch ein Albumin - Myoalbumin - genannt. Es ist - wie er anführte - noch wenig untersucht.

In der Elektrophorese wanderten die Myoalbumine am schnellsten, am langsamsten die Gruppe der Myogene, mit denen zusammen sich das Myoglobine bewegte (JACOB, 1947). Nach BROWN u. Mitarb. (1962) wandern alle Myoglobine bei pH 8,6 zur Kathode. BARANOWSKI (1939) unterschied zwischen Myogen A (Molekulargewicht 150000) und Myogen B. Beide gewann er durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat, wobei Myogen A in hexagonalen Bipyramiden oder als feine Nadeln, Myogen B in asymmetrischen Platten kristallisierten.

Das Myoglobine (ca. 0,6% des Gesamtmuskeleiweiß) ist ein dem Hämoglobin ähnliches Chromoproteid (REIN u. SCHNEIDER, 1955). Sein Molekulargewicht wird in Abhängigkeit von der Spaltung seiner Peptidketten an den Disulfidbrücken unterschiedlich angegeben: BOSCH (1951) 34000, EDELBACHER u. LEUTHARD (1957) 17000, DROSDOW (1954) 16200 - 68000.

KESZTYÜS u. VAREKESZ (1945) untersuchten die Eigenschaften von kristallinem Myoglobine der Herzmuskulatur verschiedener Tierspezies (Pferd, Rind, Hund,

Schwein, Katze), die sich bei ihnen als starke Antigene erwiesen. Die von Kaninchen gewonnenen Anti-Myoglobulin-Seren präzipitierten nur das homologe Myoglobin, nicht aber Myoglobin anderer Tierarten. Sie reagierten auch organspezifisch; arteigenes Serum-eiweiß und Hämoglobin wurden nicht präzipitiert.

f) Methoden zur Trennung von Proteingemischen

Zur Isolierung einzelner Eiweißfraktionen aus Eiweißgemischen, wie Blutserum oder Fleisch es darstellen, wurden verschiedene Methoden angewandt und entwickelt. Eines der ersten Trennungsvorgahren für Eiweiß war die Fraktionierung durch Neutralsalze. Am meisten empfehlenswert ist (HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, 1960) das Ammoniumsulfat, welches je nach Sättigungsgrad unterschiedliche Proteine ausfällt. COHN u. Mitarb. (1940) zerlegten durch Ammoniumsulfatfraktionierung Pferdeserum in fünf Komponenten. Die Reihenfolge, in der die Serumproteine ausgefällt wurden, stand in direktem Zusammenhang mit ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit. Diese Experimente machten es möglich, definierte Proteine des menschlichen Serums rein darzustellen, die bei der Immunisierung als Antigene zur Bildung von hochwertigen spezifischen Antiseren führten. Verhältnismäßig rein ließen sich allerdings nur die γ -Globuline und das Albumin darstellen (PETERSEN, 1945).

Absolut saubere Fällungen konnte man durch Neutralsalze nicht erzielen. Serumalbumin z.B. soll nach Ausfällung mit Ammoniumsulfat nur zu 5,5 % kohlehydratfrei sein (MC MEEKIN, 1940). Ohne anschließende Reinigung der Fällungsprodukte war es kaum möglich, reine Antigene für Immunisierungszwecke zu isolieren (GOODMAN u. GROSS, 1963; LESKOWITZ, 1963; OKATA u. SATO, 1963).

BEISENHERZ u. Mitarb. (1953) übertrugen die zunächst bei Blutserum angewendete Methode der Ammoniumsulfat-

fraktionierung auf Muskelextrakt. Sie erhielten amorphe Fraktionen, aus denen sich verschiedene Fermente kristallisieren ließen.

Die bedeutendsten Fortschritte der Analytik lagen auf chromatographischem Gebiet (WACHS, 1961). Man versteht darunter eine Technik, die die Adsorption, die Verteilung zwischen zwei nicht mischbaren Lösungsmitteln, benutzt, um komplexe Mischungen in ihre verschiedenen Komponenten zu zerlegen. In seiner Dissertation schrieb FLODIN (1962), daß der große Vorzug der Chromatographie für präparative und analytische Zwecke darin zu sehen ist, daß selbst komplizierteste Gemische chemisch verwandter Stoffe, die sonst einer Trennung nur schwer oder überhaupt nicht zugänglich sind, zerlegt werden können. FLODIN hielt die Säulenchromatographie für die gebräuchlichste Form. Dabei dürfen die Trägerstoffe weder zu grob noch zu fein sein, da ein zu großes Korn die Lösung zu schnell, ein feines zu langsam durchlaufen läßt. Dieses Problem hatte man sehr gut mit der Gelfiltrationsmethode gelöst. Es ist ein besonderes chromatographisches Verfahren, das sich von allen übrigen dadurch auszeichnet, daß es Trennungen von Substanzgemischen auf Grund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte erlaubt. Als Trägermaterial können z.B. Dextran-Gele in Form kleiner Kugeln verwendet werden, wie das Sephadex (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Diese vernetzten Makromoleküle sind wasserunlöslich, quellen jedoch stark, bilden dabei Poren und ein dreidimensionales Netzwerk, dessen Maschengröße durch den Vernetzungsgrad angegeben wird. Moleküle, deren Durchmesser mit der Gelporengröße übereinstimmt, setzen sich dort fest. Die etwas größeren werden in den Kugelhohlräumen hängen bleiben, während sich die großen Moleküle nur außerhalb der Gelphase befinden können. Die größten Teilchen verlassen infolgedessen die Säule zuerst, die kleinsten müssen von einem geeigneten Elutionsmittel ausgespült werden

(PORATH u. FLODIN, 1963). Die Gelfiltration wurde auch als eine sterische Ausscheidung von Lösungen mit Molekülen unterschiedlicher Größe aus der Gel-phase bezeichnet (LAURENT u. KILLANDER, 1964).

PETERSON u. SOBER (1954) hielten die Säulenchromatographie für Analysen, Präparationen, Reinigung und Konzentrierung von Proteinen besonders geeignet wegen ihrer verhältnismäßig großen Kapazität und der relativ hohen Reinheit der Fraktionen. Auch zu Molekulargewichtsbestimmungen wurde sie empfohlen (ANDREW, 1940; WHITAKER, 1950). Oft bevorzugte man sie wegen ihrer scharfen Separation zur Trennung größerer Mengen von Proteinen, und die besseren Ergebnisse gegenüber den konventionellen Methoden schienen hervorstechend (RHODES u. Mitarb., 1958; MANDELES, 1960).

Ausgezeichnete Erfolge hatten FLODIN u. KILLANDER (1962) bei der Fraktionierung von Humanserumproteinen. Sie konnten die Proteine in drei Hauptfraktionen isolieren, die ziemlich rein waren. Die Gelfiltration erwies sich als eine einfache, schnelle und gute Methode zur Fraktionierung von Serumalbumin, Hämoglobin und Glukose für klinisch-diagnostische Verwendungszwecke (BILL u. Mitarb., 1960). HANSON u. JOHANSSON (1960) isolierten verschiedene antigene Gruppen von Human- γ -Globulinen, die sie durch Fraktionierung über Sephadex erhielten, und untersuchten sie hinsichtlich ihrer immunologischen Aktivität. Wie VAERMAN u. HEREMANS (1962) mit der gleichen Methode feststellten, handelte es sich bei den γ -Globulinen um drei strukturell verwandte Molekülarten von Serumproteinen.

Eine sauberen Trennung von Chromoproteiden mittels Gelfiltration war mit Sephadex-G-75 möglich (NULTSCH, 1962). Man konnte die Säulenchromatographie anwenden, um verschiedene Muskeleiweißkörper aus einem komplexen Proteingemisch zu isolieren und erhielt Fraktionen,

die mit Aldolase, dem Tropomyosin und dem γ -Protein von DUBUISSON identisch zu sein schienen (PERRY u. ZYDOWO, 1959). Zur Aufklärung der strukturellen Unterschiede des Myoglobins von Rindermuskulatur durch chromatographische Darstellung und Fraktionierung trugen die Arbeiten von QUINN u. PEARSON (1964) wesentlich bei.

2. Immunisierungsverfahren

Über die Herstellung von Antiseren liegt heute umfangreiche Literatur vor, in der auch die Schwierigkeiten, die bei der Herstellung eines qualitativ guten Antiserums auftreten können, gezeigt werden. Man fordert von einem Antiserum, daß es

1. absolut klar und steril, nicht opaleszierend,
2. hochwertig und
3. artspezifisch

sein soll. Für die Herstellung präzipitierender Antiseren zur biologischen Eiweißdifferenzierung kam fast ausschließlich das Kaninchen in Betracht, obwohl man bisweilen mit 50% Versagern bei den Versuchstieren rechnen mußte (UHLENHUTH u. SEIFFERT, 1930). Ob das Antigen intraperitoneal, subkutan, intramuskulär oder intravenös injiziert wurde, war überwiegend abhängig von dem verwendeten Material. Im allgemeinen wurde die intravenöse und die intraperitoneale der subkutanen Injektion vorgezogen. UHLENHUTH u. SEIFFERT (1930) hielten die intravenöse Methode für die wirksamste. Für die Injektion von Fleischsaft verwendeten sie bei ihren Versuchen auch die Immunisierung intraperitoneal, da das Bauchfell relativ unempfindlich ist.

Zur Verstärkung der Antikörperbildung bedient man sich verschiedener Verfahren: Bei Pferden fand RAMON u. E.LEMETAYER (1931) eine Steigerung der Antitoxinbildung, wenn gleichzeitig mit der subkutanen Injektion des Antigens eine aseptische Gewebsreizung erfolgte. Eine besondere Förderung der Antikörperbildung wird der Verwendung von Adjuvantien zugeschrieben. Diese Stoffe

sollen das Antigen vor zu schnellem Abbau und Verdünnung im Organismus schützen und die Antikörperbildung erhöhen (FINGER, 1961). Experimentell wird dies dadurch erzielt, daß zusammen mit dem Antigen noch andere Begleitstoffe in Mischung oder in Form einer mehr oder weniger festen Adsorption injiziert werden. Am häufigsten werden Metalladjuvantien (z.B. $\text{Al}(\text{OH})_3$; Fe Cl_3 ; Alaun) oder das Freund'sche Adjuvans benutzt. Letzteres besteht aus Paraffinöl, einem Emulgator und abgetöteten, getrockneten Mykobakterien (FREUND u. MC DERMOTT, 1942).

EISNER (1959) gewann bei Immunisierungen mit Adjuvans fünfmal mehr Milzbrandantikörper als mit zahlreichen intravenösen Injektionen. Bei der Herstellung von Antivollseren, bei denen es darauf ankam, Antikörper gegen möglichst zahlreiche, verschiedene Proteinfractionen zu erzeugen, gaben FEY (1964) und auch RUCKLI (1962) der Immunisierungsmethode mit Freund'schem Adjuvans eindeutig den Vorzug. Auch für die Erzeugung von Antisera für die biologische Eiweißdifferenzierung wurde die Immunisierung mit Adjuvans erfolgreich angewandt (GUINÉE u. WILLEMS, 1962).

Nach H.SCHMIDT (1955) wird die Art der gebildeten Antikörper stark durch den Injektionsmodus des Antigens beeinflusst. Beim Kaninchen erzeugte z.B. die intrakutane oder subkutane Injektion von Pneumokokken (JULIANELLE, 1930) oder Streptokokken (SEEGAL u. HEIDELBERGER, 1934) hauptsächlich artspezifische Anti-Nukleoproteide, die intravenöse Injektion hingegen führte zur Bildung typenspezifischer Antikörper. Wenn TREFFERS u.Mitarb. (1947) statt Kaninchen-Serumalbumin das Serumglobulin zur Immunisierung von Pferden benutzten, zeigten beide Antigene auffallend verschiedenes Verhalten. Serumalbumin führte nur subkutan injiziert zur Antikörperbildung vom Antitoxintyp (wasserlöslich, elektrophoretisch zwischen dem β und γ -Globulin wandernd). Intravenös verabreichtes Serumglobulin erzeugte hingegen Antikörper vom Antieiweißtyp (wasserunlöslich, elektrophoretisch dem γ -Globulin entsprechend).

Wie H.SCHMIDT (1955) schrieb, ist demnach nicht nur der Immunisierungsweg (subkutan oder intravenös), sondern auch die Eigenschaft des Antigens von Bedeutung für die Art der gebildeten Antikörper, ebenso wie in bestimmtem Umfang noch die Tierart, die Immunisierungsdauer und die jeweils gegebene Antigenmenge zu berücksichtigen sind, wenn man das erzeugte Antiserum auf seine qualitative und quantitative Zusammensetzung prüfen will.

3. Präzipitationsmethoden

a) Präzipitation im Röhrchen

Zum ersten Mal beobachtete KRAUS (1897) die Immunpräzipitation in zellfreien Flüssigkeiten als eine Reaktion zwischen Antikörpern und Antigenen. Später wurde auch die antigene Wirkung von Bluteiweißsubstanzen entdeckt (TCHISTOVITCH, 1899). Nach H.SCHMIDT (1955) ist die Präzipitation die einfachste Reaktion zwischen Antigen und Antikörper, die in vitro vor sich geht. Dabei binden sich Präzipitinogen und Präzipitin zu einem sichtbaren Komplex, dem Präzipitat.

Zu Beginn dieses Jahrhunderts führte UHLENHUTH (1903) eine Änderung der bisher geübten Originaltechnik der Präzipitationsreaktionen ein, in welcher Antigen und Antikörper direkt in einem Röhrchen gemischt wurden. FORNET u. MÜLLER (1910) empfahlen, beide Reagenten vorsichtig zu überschichten. An der Grenzfläche entsteht bei positiver Reaktion eine scharfe Trübungszone, die eine Antigen-Antikörper-Reaktion in dem verwendeten System sichtbar werden läßt. Die Empfindlichkeit der Methode ließ sich noch steigern, wenn die Reaktion als Ringtest ausgeführt wurde. Das hob ihre Eignung für die biologische Eiweißdifferenzierung besonders hervor (UHLENHUTH, 1903).

Eine für quantitative Bestimmungen gut durchführbare Technik entwickelte RAMON (1922). Er registrierte die für die Ausbildung des Präzipitates im Röhrchen notwendige Zeit und arbeitete mit konstantem Antigen- und variabelm Antikörpersystem. DEAN u. WEBB (1926)

benutzten im Gegensatz dazu verschiedene Mengen Antigen bei konstant gehaltenem Antikörpergehalt. Beide Methoden werden auch α - und β -(RAMON)Verfahren genannt. Man versuchte, das Auftreten des Präzipitates in kürzester Zeit hervorzurufen und das optimale Verhältnis von Antigen und Antikörper zu finden.

Nach H.SCHMIDT (1955) und SINELL (1961) ist das α -Verfahren für die biologische Eiweißdifferenzierung am besten geeignet. Die Feststellung von Spezifität und Titer des Antiserums erfolgte hierbei durch Verdünnen der Antigenlösungen, während die Seren unverdünnt angewendet wurden. SINELL empfahl, die Antigenlösung auf eine einheitliche Bezugsgröße einzustellen, z.B. den Eiweißgehalt. Seiner Meinung nach hat sich der Ringtest wegen des geringen Zeitaufwandes und der erheblichen Ersparnis an spezifischem Serum in der biologischen Eiweißdiagnostik besonders bewährt.

b) Präzipitation im Agargel

Die Verwendung von Gelen als Diffusionsmedien für immunologische Untersuchungen wurde Anfang des Jahrhunderts empfohlen (ARRHENIUS, 1907; BECHHOLD, 1905). Der wesentliche Unterschied und Vorteil gegenüber der Methode im Röhrchen nach UHLENHUTH besteht darin, daß im Gel für jedes einzelne Antigen eine isolierte Präzipitationslinie entsteht, die je nach der Diffusionsgeschwindigkeit und Konzentration des Antigens näher oder weiter entfernt von der Auftragungsstelle lokalisiert ist. Die Diffusionsgeschwindigkeit hängt vor allem von der Molekülgröße ab; hochmolekulare Globuline werden in geringerer Entfernung vom Ausgangspunkt präzipitiert als Antigene niedrigen Molekulargewichts. Immunologisch identische Eiweiße ergeben Präzipitationslinien, die ohne Lücke ineinander übergehen. Eine partielle immunologische Antigenverwandtschaft äußert sich durch Präzipitationsbögen, die nur teilweise ineinanderlaufen und einen sogenannten "Sporn" bilden (SCHWICK u. STÖRIKO, 1964).

LOUDIN (1946) entwickelte eine Methode für Agargel-diffusionsteste in Röhrchen. Er verwendete schmale Küvetten, die Agar mit Antiserum gemischt enthielten, und gab auf die Oberfläche der Gelsäule die Antigenlösung. Die Präzipitation wurde in Form von Banden im Agar sichtbar. Seine Experimente waren die Grundlagen für weitere Immunreaktionen in Gelen.

Am gebräuchlichsten ist heute die von OUCHTERLONY (1949) eingeführte Plattenmethode der Doppeldiffusion in zwei Dimensionen. Er goß in Petrischalen oder auf Glasplatten eine gleichmäßig dicke Schicht Agargel, aus der er mehrere Löcher nach bestimmtem Muster ausstanzte. Diese Bassins wurden je nach Wahl mit Antigenlösung bzw. Antiserum gefüllt. Nach einiger Zeit bildeten sich an den Stellen, wo Antigen und Antikörper infolge ihrer Diffusion zusammentrafen, Immunpräzipitate, die meist die Form von Bögen hatten. OUCHTERLONY zeigte, daß jedes Präzipitationsband einem Antigen-Antikörperpaar entsprach. Als Verbesserung gegenüber der UHLENHUTH'schen Methode hob er hervor, daß Reagenten, die im UHLENHUTH-Röhrchen einheitlich erschienen, sich bei der Agargeldiffusion sehr oft als serologisch inhomogen erwiesen. Seiner Meinung nach sind die Präzipitationsmethoden im Gel eine sinnvolle Ergänzung der klassischen Methoden. Sie bringen, wie er betonte, den entscheidenden Fortschritt, daß man infolge unterschiedlicher Diffusionsgeschwindigkeiten der einzelnen Antigen-Komponenten eines Gemisches heterogener Antigene (z.B. Blutserum) in der Lage ist, eine Differenzierung der verschiedenen Reagenten vorzunehmen. Die Immundiffusionsmethoden im Gel wurden als einfach, empfindlich und billig bezeichnet.

Um Material zu sparen, entwickelte WADSWORTH (1957) eine Mikromethode für die Plattentechnik nach OUCHTERLONY, die eine schnellere Auswertung der

Proben möglich machen sollte. Sie wurde besonders von CROWLE (1958) - wegen der größeren Empfindlichkeit - empfohlen. Eine Erweiterung der gewöhnlichen immunologischen Identifizierung der Reagenten, die an der Präzipitation teilnehmen, wurde durch Anfärben der Präzipitate erreicht. Passende Färbemethoden ließen die Präzipitationsmuster besser zum Ausdruck kommen, (BJÖRKLUND, 1954; URIEL u. GRABAR, 1956).

Als einfache und elegante Methode von hoher Spezifität mit eindeutiger Aussage über die Identität, Nichtidentität und Verwandtschaft der Antigene bezeichnete WACHENDÖRFER (1964) die Agargelpräzipitation. Er hielt sie allerdings trotz ihrer Empfindlichkeit in quantitativer Hinsicht den anderen Methoden für unterlegen, da die Präzipitationsbande nur eine schmale Berührungsstelle darstellt und ein großer Teil des Antiserums verloren geht, d.h. im Gel hängen bleibt. Zur Ausschaltung des Zonenphänomens, worunter er negative und schwache Präzipitationen bei Antikörperüberschuß versteht, hielt er eine Verdünnung des Antiserums für notwendig.

Bei umfangreichen Untersuchungen in der Immunologie klinischer Erkrankungen wandten VORLAENDER u. ROSS (1961) die Arbeitsweise nach OUCHTERLONY an. Sie hoben die große Zuverlässigkeit der Methode hervor und betonten, daß sie gestattet, die Reaktion eines bestimmten Serumfaktors mit seinem Substrat in einem einfachen, direkten Präzipitationsverfahren sichtbar zu machen. An Hand multipler Präzipitationszonen gelang es ihnen, neben homologen auch heterologe Antigen-Antikörper-Reaktionen nachzuweisen, die im UHLENHUTH-Röhrchen verborgen bleiben. Der als Nachteil angesehene Zeitfaktor, den die Präzipitation in Anspruch nehmen kann, wird für sie ausgeglichen durch die Sicherheit und Spezifität des gewonnenen Präzipitates. Ein weiterer Nachteil war darin zu sehen, daß bei dieser Methode nur qualitative, nicht aber quantitative Aussagen zu erwarten sind. Allerdings bewies

DARCY (1960), daß quantitative Bestimmungen in bestimmten Grenzen auch bei diesem Testverfahren möglich sind. Er beobachtete, daß die Position einer bestimmten Präzipitationslinie mit der Konzentration des Antigens korreliert ist, und maß dazu unter standardisierten Bedingungen den Abstand der Linien vom Antiserumbassin.

KORNGOLD u. VAN LEEUWEN (1959) erklärten verbreiterte Banden mit einem Antigen- oder Antikörperüberschuß. Es kann vorkommen, daß ein freibleibender, ungebundener Rest von Antigen oder Antikörper oder auch von löslichen Antigen-Antikörperkomplexen noch eine Strecke weiter diffundiert, um erst später als zweite Bande zu erscheinen, die in diesem Falle keinem heterologen Immunsystem entspricht.

Wegen ihrer hohen Empfindlichkeit und Sparsamkeit bezüglich des Materialverbrauchs empfahl HITZIG (1963) die Agar-Gel-Präzipitationsmethoden in der klinischen Medizin. Zum Vergleich der Antigenstruktur von zwei Proteinen verwendete er die Dreiecksanordnung der Bassins. Für semiquantitative Bestimmungen einzelner Proteine hielt er die "Rosettenanordnung" für besonders geeignet und rechnete bei Verdünnung des Antigens mit einem Ablesefehler von einer Titerstufe.

Ein besonderer Vorteil erschien SCHOOP u. WACHENDÖRFER (1963) die Möglichkeit der exakten Anordnung des Systems und die einfache, zeitsparende Anwendung, als er Fälle von klassischer Schweinepest diagnostizierte. Im Vergleich mit anderen serologischen Methoden war die Fehlerbreite geringer. Überdies konnten in ein- und demselben Arbeitsgang verschiedenartige Sensibilisierungsvorgänge gleichzeitig sichtbar gemacht werden. Allerdings ließen sich, wie beim Agglutinations- oder Komplementbindungsverfahren,

nur komplette, im Serum zirkulierende Antikörper nachweisen, nicht inkomplette Antikörper, die an Zelloberflächen fixiert sind (VORLAENDER u. ROSS, 1961).

Die Antigenstruktur menschlicher Serumproteine untersuchten ROULET u. Mitarb. (1960). Durch das Auftreten heterologer Präzipitationsreaktionen gelang es ihnen, zu zeigen, daß die menschlichen Serumproteine zahlreiche gemeinsame Antigen determinanten mit den Seren von vielen Säugetieren besitzen. Die Ergebnisse ihrer Experimente erlaubten die Annahme, daß Immunsereen gegen Proteine viele Antikörper enthalten, die mit den betreffenden Determinanten des Antigens spezifisch reagieren. Diese Tatsachen führten sie auf einfache oder doppelte Spornbildung an den Präzipitatbögen im Agargel zurück. Sie legten dar, daß eine so feine Analyse komplexer Antigengemische durch die klassischen Präzipitationstechniken nicht möglich sei.

Auch bei der Bestimmung von Haptoglobingruppen erwies sich der Agardiffusionstest als besonders einfach und zuverlässig (ALY u. Mitarb., 1961). Ebenso war es NAZARETH u. Mitarb. (1962) nur durch den Plattentest möglich, in zahlreichen Tierblutseren gemeinsame Komponenten nachzuweisen. Sie hoben besonders die Spezifität des γ -Globulins hervor, welches bei den von ihnen verwendeten Versuchstieren keine Kreuzreaktion zeigte. Die Antigenität von verschiedenen Polypeptiden bei Kaninchen testete MAURER (1962). Auch ihm gelang es nur mit der Agargeldiffusion, die Heterogenität der einzelnen Antigene aufzudecken. WEIGEL u. MC CONAHEY (1962) benutzten die gleiche Methode zur Aufdeckung von Verunreinigungen bei Antigen- und Antikörperlösungen mit besserem Erfolg als die früher gebräuchlichen Verfahren.

Auch für die Praxis der Lebensmitteluntersuchung wurde das Agargeldiffusionsverfahren verschiedentlich angewandt. SCHEIBNER (1960) hielt die Präzipitation im Agargel zur serologischen Eiweißdifferenzierung für besonders geeignet, da er spezifische Ergebnisse bei der Untersuchung von Fleisch, Fleischerzeugnissen und Fischwaren erhielt und - im Gegensatz zur UHLENHUTH'schen Methode - bedenkenlos trübe Antigenextrakte verwenden konnte. Als Nachteil bezeichnete er den verhältnismäßig hohen Zeitaufwand, als besonderen Vorteil die Sicherheit und Einfachheit, da sich die optimale Konzentration durch die Diffusion von selbst einstellt.

Mittels Präzipitation im Gel wies BUBLOZ (1962) einen 10%igen Zusatz von Pferdefleisch in Fleischwaren nach. Als Vorteil gegenüber der Präzipitation nach UHLENHUTH erschien auch ihm die Möglichkeit, trübe Antigene (Fleischextrakte) verwenden zu können und die Ergebnisse zu photographieren und damit zu dokumentieren. Zur serologischen Identifizierung von Fleisch verschiedener Tierspezies verwendete VAN DEN HEEVER (1962) sowie PIKE u. SULKIN (1957) die Agargeldiffusionsmethode. Ebenso geeignet war sie für Untersuchungen über die serologische Verwandtschaft verschiedener Säugetiere bei der Differenzierung von Organextrakten, Blutmehl, getrocknetem Fleisch und ungekochtem Wurstgut (HAY, 1962).

Als den bedeutsamsten Fortschritt auf dem Gebiet der Immunodiffusionstechnik bezeichnete CROWLE (1961) die Entwicklung einer neuen Methode, der IMMUNOELEKTROPHORESE. Diesen Begriff prägten WILLIAMS u. GRABAR (1955). Die meisten Modifikationen ihrer Methode gehen auf Informationen von GRABAR u. BURTIN (1960) zurück. Einer der Reagenten wird, ähnlich wie bei der Papierelektrophorese, elektrophoretisch fraktioniert, bevor er mit dem anderen zusammentrifft und durch eine Immunpräzipitationsanalyse - technisch übernommen

von OUCHTERLONY - bestimmt wird. Zu den Vorzügen der Doppeldiffusion kam die Möglichkeit der elektrophoretischen Auftrennung und damit einer weiteren Charakterisierung der Reagenten.

Wie CROWLE darlegte, werden Substanzgemische, die als Antigen homogen zu sein scheinen und mit anderen Methoden nicht analysierbar sind, auf Grund ihrer verschiedenen elektrophoretischen Motilität durch die Immunelektrophorese als heterogen erkannt. Zunächst wurde die Methode als Makrotechnik verwendet. In Anlehnung daran entwickelte SCHEIDEGGER (1955) für immunoelektrophoretische Analysen kleiner Mengen eine zeit- und materialsparende Mikrotechnik. Die Auswertung und Definition der Präzipitationsmuster erfolgte nach ihrer elektrophoretischen Lage, ihrem relativen Abstand vom Diffusionszentrum und nach ihrer Form (HIRSCHFELD, 1962). Das Auffinden der Banden wurde durch die Anwendung geeigneter Färbemethoden erleichtert (GÖTZ, 1957).

GILLERT (1962) sah den Nachteil der Methode darin, daß sie bei quantitativen Untersuchungen versagte und von der Qualität der Immunsereen abhängig ist. Für vorteilhaft jedoch hielt auch er, daß sonst nicht unterscheidbare Fraktionen von Eiweißsystemen erkannt werden können.

Auf Grund ihres hohen Trennvermögens und ihrer Empfindlichkeit war die Immunelektrophorese also eine besonders wertvolle Hilfe, das Vorhandensein von Proteinen anzuzeigen und sie auf Grund ihrer elektrophoretischen und immunologischen Eigenschaften zu identifizieren (KOLTAY, 1960; PEETOM, 1963). Diese Voraussage scheint sich bewahrheitet zu haben, denn bis heute liegen unzählige Arbeiten vor, die die Verwendung dieser Methode empfehlen. Besonders bei der Untersuchung von Serumproteinen hat sie viele Erfolge gebracht (SCHWICK, 1958; HIRSCHFELD, 1960).

Die Leistungsfähigkeit der Arbeitsweise machte sie auch zur Untersuchung von Lebensmitteln geeignet; so wurde sie zur Analyse von Milchpräparaten erfolgreich angewendet (ROULET u. Mitarb., 1961; SCHOBER u. HEIMBURGER, 1960). Immunoelektrophoretische Untersuchungen über die antigene Verwandtschaft zwischen verschiedenen Gattungen der Säugetiere führten DURAND u. SCHNEIDER (1962,I) durch. Dabei beobachteten sie, daß nicht immer das spezifische, homologe Antiserum die besten Antigen-Antikörper-Präzipitate liefert, sondern manchmal das Antiserum gegen eine verwandte Gattung bessere Ergebnisse zeigt. Als andere praktische Anwendungsmöglichkeit wurde von ihnen empfohlen, die Immunoelektrophorese zur Aufdeckung von Verfälschungen bestimmter Fleischarten zu benutzen (1962,II). Sie stellten fest, daß Fleischsaft, durch Extraktion gewonnen, kein reines Produkt ist, sondern aus einer Mischung von Serumproteinen und spezifischen Muskeleiweißen, die sie "Myoglobine" nennen, besteht. Die "Myoglobine", deren Wanderungsweg auf dem Objektträger gut sichtbar sein soll, gaben bei ihren Untersuchungen keine Präzipitate, weil die verwendeten Immunsereen spezifische Anti-Blutserum-Seren waren.

In Ergänzung zu den bisher vorliegenden Ergebnissen von MANTEUFEL u. TOMIOKA (1924); ROSENBERG (1928) und SINELL (1961) sollen in der vorliegenden Arbeit die immunologischen Eigenschaften verschiedener Fraktionen wasserlöslicher, nativer Muskelproteine untersucht werden. Besonders deshalb, weil in erster Linie die wasserlöslichen Proteine für eine Differenzierung in verarbeiteten Fleischerzeugnissen im Rahmen der Lebensmittelüberwachung in Frage kommen. Diese Versuche sind außerdem wichtig für weitere Untersuchungen über das Verhalten der gleichen Proteine nach Hitzedenaturierung.

III. Eigene Untersuchungen

1. Material und Methoden

Antigene

a) Vorversuche mit Serum

Zunächst wurden Anti-Serum-Seren gegen Pferde-, Rinder-, Hammel-, Schweine- und Hundeserum hergestellt. Die Serumantigene wurden vor ihrer Verwendung zur Injektion - zur Vermeidung anaphylaktischer Schockerscheinungen bei den Versuchstieren - 30 Minuten im Wasserbad bei 56°C inaktiviert, dann über Klär- und Entkeimungsfilter gegeben und portionsweise tiefgefroren bis zum Gebrauch aufbewahrt.

b) Myogen A nach Baranowski

Die Herstellung erfolgte nach den Angaben aus der Originalarbeit von BARANOWSKI (1939). Fett- und sehnenfreies, schlachtwarmes Rindfleisch wurde im Fleischwolf zerkleinert, und die löslichen Eiweiße mit Aqua dest. und Eis 1/2 h im Kühlschrank extrahiert, die Lösung zentrifugiert, der Überstand durch Filterpapier filtriert. Das Filtrat verblieb über Nacht im Kühlschrank, wurde dann erneut zentrifugiert und der Überstand unter Verwendung eines Magnetrührers mit gepuffertem Ammoniumsulfat bis zum Sättigungsgrad von 40% versetzt. Nach zweistündigem Aufenthalt im Kühlschrank wurde der entstandene Niederschlag N₁ abzentrifugiert, zweimal mit 40%(NH₄)₂SO₄-Lösung gewaschen, mit Aqua dest. aufgenommen und gegen Leitungswasser dialysiert. Der Überstand wurde mit gepulvertem Ammoniumsulfat auf den Sättigungsgrad von 60% gebracht und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der abzentrifugierte Niederschlag N₂ wurde mit Aqua dest. aufgenommen, im Wasserbad 15 Minuten bei 52°C gehalten, anschließend abgekühlt und über eine Nutsche gefiltert. Dann wurde aus der durchgelaufenen Flüssigkeit alles restliche Protein mittels Ammoniumsulfat ausgefällt und scharf auf der Nutsche abgesaugt. Das erhaltene Eiweiß wurde mit Aqua dest. aufgenommen, der pH-Wert der Lösung mit

o, in Na OH auf 5,9 eingestellt und 1/10 des Volumens m/3 Phosphatpuffer zugefügt (pH 5,9). Dieser Flüssigkeit wurde so viel gepulvertes Ammoniumsulfat zugesetzt, bis eine feine Trübung auftrat. Nach dreitägiger Aufbewahrung im Kühlschrank ließ sich ein feiner Niederschlag feststellen, der abzentrifugiert, wiederholt mit Ammoniumsulfatlösung gewaschen, anschließend in Aqua dest. aufgenommen, bis zur Ammoniumsulfatfreiheit (geprüft mit Neßler's Reagenz) dialysiert und schließlich lyophilisiert wurde. Das reinweiße Lyophilisat sollte das Myogen A sein.

c) Wasserlösliche, native Muskeleiweiße mit Ammoniumsulfat gefällt

Schieres, schlachtwarmes Rindfleisch wurde im Fleischwolf zerkleinert und mit physiologischer NaCl über Nacht im Kühlschrank extrahiert. Der Extrakt wurde zentrifugiert, der Überstand durch Nylonwatte filtriert und mit 100% gesättigter Ammoniumsulfatlösung bei verschiedenen Sättigungsgraden in 5 Fraktionen separiert.

Fraktion 1)	waren die Proteine, die bei 30% Sättigung
" 2)	ausfielen,
" 3)	40% Sättigung
" 4)	ausfielen,
" 5)	50% Sättigung
	ausfielen,
	60% Sättigung
	ausfielen,
	90% Sättigung
	ausfielen.

Diese Sättigungsgrade wurden willkürlich gewählt, in Anlehnung an Experimente von COHN u. Mitarb. (1940), bei denen Serumeiweiße fraktioniert und wie folgt charakterisiert wurden:

34% Sättigung	- hauptsächlich γ -Globuline
40% "	- γ -, β -, α -Globuline
50% "	- β - und α -Globuline, Mucoproteide,
60% "	- hauptsächlich kristallines Albumin,
68% "	- kristallines Albumin, Glykoproteide
	u. a. m.

Die nach Ausfällung mit Ammoniumsulfatlösung gewonnenen 5 Fraktionen wurden in Ampullen abgefüllt, lyophilisiert und bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt.

d) Wasserlösliche, native Muskeleiweiße durch Gelfiltration gewonnen

Schieres, schlachtwarmes Rindfleisch wurde im Fleischwolf zerkleinert und über Nacht mit Aqua dest. im Kühlschrank extrahiert, am folgenden Tage zentrifugiert (0° - 2°C , Kühlzentrifuge) und über Filterpapier gegeben. Um den Eiweißgehalt zu erhöhen, wurde der Extrakt im Rotationsverdampfer bei Zimmertemperatur auf 1/10 seines Volumens eingeeengt und anschließend nochmals scharf zentrifugiert, um eventuelle Niederschläge zu entfernen. In späteren Versuchen wurde das Einengen durch vollständiges Lyophilisieren des Muskel-extraktes ersetzt, was den Vorteil hatte, daß größere Mengen eines Ausgangsmaterials für längere Zeit aufbewahrt und bei Bedarf mit Aqua dest. wieder aufgenommen werden konnten.

Als Trägermaterial für die Fraktionierung wurde das stark vernetzte Dextran-Gel SEPHADEX-G-75, new bead form (Pharmacia, Uppsala/Schweden) mit der Ausschlußgrenze 50 000 (ca. Mol.-Gew.) benutzt. Zum Packen der Chromatographiesäule wurde das pulverförmige Sephadex-G-75 in Aqua dest. aufgeschwemmt und zum Quellen über Nacht im Kühlschrank belassen. Durch nochmaliges Waschen in Aqua dest. und Dekantieren wurde sehr feinkörniges Material entfernt, wodurch sich eine bessere Durchflußgeschwindigkeit erzielen ließ. Dann konnte das Gel in die Säule gegeben werden (Maße: innerer Durchmesser: 25,4 mm; Höhe: 450 mm), die durch einen Kühlmantel mit Leitungswasser bei annähernd gleicher Temperatur von 13 - 15°C gehalten wurde. Die Muskeleiweißlösungen, die fraktioniert wurden, hatten einen unterschiedlichen Eiweißgehalt, der zwischen 4,5 - 12,6% schwankte (gemessen nach LOWRY, 1951).

Sie wurden bei den einzelnen Fraktionierungen, in der Absicht, die optimale Kapazität zu finden, in Mengen von 3,0 - 10,0 - 15,0 oder 25,0 ml auf die Säule gegeben und mit Aqua dest. eluiert. Die Eluate wurden mit einem Fraktionssammler in 40 - 80 Fraktionen à 4,0 ml/20 - 25 Minuten aufgefangen und ihr Eiweißgehalt spektrophotometrisch bei der Wellenlänge von 760 m μ nach der Methode von LOWRY bestimmt. Zur Fraktionierung wurde das Elutionsmittel (Aqua dest.) bis zum oberen Rand des Gelbettes abgelassen, und der Muskelextrakt vorsichtig aufpipettiert. Sobald der Extrakt in die oberste Schicht des Gelbettes eingedrungen war, wurde mit zunächst kleineren Mengen Elutionsmittel nachgespült. Anschließend wurde laufend eluiert, bis der gesamte aufgetragene Muskelextrakt die Säule verlassen hatte. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels Präzipitation im Uhlenhuth-Röhrchen auf ihre antigenen Eigenschaften gegenüber Anti-Rinderserum geprüft, lyophilisiert und im Exsikkator über Phosphor-pentoxyd aufbewahrt.

e) Alkoholgefälltes Muskelantigen

Neben den vorstehend erwähnten wurde für einzelne Fragestellungen ein Antigen verwendet, das durch Ausfällen von Muskeleiweißen mittels Alkohol gewonnen und zur Aufbewahrung lyophilisiert worden war (aA). Dieses Antigen und sein entsprechendes Antiserum stammten aus Institutsbeständen. Sie waren nach den von SINELL (1961) veröffentlichten Angaben hergestellt worden.

2. Immunisierungen

Bei den Immunisierungen wurden als Versuchstiere aus schließlich 5-10 Monate alte Kaninchen verwendet, deren Gewicht ca. 3,5 - 4,5 kg betrug. In den Vorversuchen zur Gewinnung von Anti-Serum-Seren wurden insgesamt 19 Kaninchen mit inaktivierten Serumantigenen immunisiert. Die

Gesamtdosis pro Tier wurde verschiedentlich variiert (32,0 ml - 24,0 ml - 12,0 ml, 10,0 ml). Der Injektionsmodus war intravenös und subkutan oder nur intravenös. Immunisiert wurde über einen Zeitraum von 3-4 Wochen, wenn die Tiere danach keinen spezifischen Titer hatten, wurden sie aus dem Versuch genommen. Erwiesen sich die Seren bei der Probepräzipitation als spezifisch und besaßen sie einen ausreichenden Titer (s.S.29), wurden sie zu 1,0 ml in Ampullen abgefüllt, lyophilisiert und bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt. Die gleiche Aufbewahrung erfolgte auch bei allen anderen Seren (Tabelle I).

Zur Immunisierung mit Myogen A nach Baranowski wurden zwei Kaninchen verwendet, die in einem Zeitraum von 4 Wochen fünf intravenöse Injektionen von je 15,0 mg lyophilisiertem Myogen A, aufgenommen in 2,0 ml steriler, physiologischer NaCl, erhielten (Tabelle III). Drei Kaninchen wurden mit kristallinem Serumalbumin vom Rind immunisiert (bezogen vom SERVA-Entwicklungslabor, Heidelberg). Pro Injektion wurden 30,0 mg lyophilisiertes Albumin in 2,0 ml steriler, physiologischer NaCl gelöst und insgesamt 5 intravenöse Injektionen in 3 Wochen verabreicht, (Tabelle II).

16 Kaninchen wurden mit "Sephadex"-fraktionierten Eiweißen immunisiert. 2 Hauptfraktionen, deren Auswahl später beschrieben wird, wurden als Antigenmaterial verwendet und mit F I und F II bezeichnet. Ein Kaninchen (Nr.3156) erhielt in einem Zeitraum von ca. 3 Wochen 90,0 mg F I; 5,0 mg und 1,0 ml sterile, physiologische NaCl wurden dann zusammen mit 1,0 ml Freund'schem Adjuvans komplett intrakutan medial und lateral in die Hinterläufe injiziert; 25,0 mg in steriler, physiologischer NaCl nach 14 Tagen subkutan verabreicht. Nach weiteren 2 Tagen wurden 25,0 mg in physiologischer NaCl intravenös und - als letzte Injektion - am folgenden Tag nochmal 30,0 mg intravenös gegeben.

Ein weiteres Kaninchen (Nr.3157) erhielt bei gleichem Injektionsmodus eine Gesamtdosis von 65,0 mg F I.

2 Tiere bekamen je 145,0 mg Antigen F I - gelöst in steriler, physiologischer NaCl - intravenös injiziert (Nr. 3160 und 3161).

6 Tiere wurden mit insgesamt 150,0 mg F I intravenös pro Tier immunisiert. In 4 Wochen wurden 5 x 30,0 mg Antigen (in 2,0 ml steriler, physiologischer NaCl aufgenommen) pro Injektion verabreicht (Nr.3166, 3167, 3168, 3169, 3170, 3171).

Alle Tiere reagierten spezifisch, wurden entblutet und das Antigen wie oben behandelt und aufbewahrt.

Mit F II wurden 6 Kaninchen immunisiert. 2 Tiere (Nr. 3164, 3165) im gleichen Modus wie Nr. 3156, 3157, mit Freund'schem Adjuvans (Gesamtdosis pro Tier : 85,0 mg), 2 Tiere, Nr. 3162, 3163, erhielten insgesamt je 145,0 mg Antigen in steriler, physiologischer NaCl intravenös injiziert, innerhalb von 3 Wochen. 2 weitere Kaninchen - Nr. 3172, 3173 - bekamen die doppelte Dosis von Nr. 3162, 3163, also 290,0 mg in steriler, physiologischer NaCl aufgenommen, verteilt auf einen Zeitraum von 3 Wochen.

3. Präzipitationen

a) Im Röhrchen nach Uhlenhuth

Die Reaktionen wurden im Überschichtungsverfahren in kleinen Röhrchen von ca. 2,5 mm Weite und 30 mm Länge angesetzt (α -Verfahren). Zuerst wurde das stets unverdünnte Antiserum mit einer Kapillarpipette in die Röhrchen eingefüllt und dann vorsichtig das Antigen ebenfalls mit einer Kapillare überschichtet. Die Berührungszone beider Flüssigkeiten markierte sich als scharfe Grenzfläche. Das lyophilisierte Antiserum wurde zur Verwendung mit 1,0 ml sterilem Aqua dest. pro Ampulle aufgenommen. Die Feststellung des präzipitierenden Titors erfolgte durch Anlegen von Verdünnungsreihen des Antigens in physiologischer NaCl.

Für exakte quantitative Untersuchungen ist jedoch auch eine einheitliche Bezugsgröße notwendig (SINELL, 1961); deshalb wurde bei allen Antigenen der Eiweißgehalt auf 0,1g% als Ausgangskonzentration eingestellt, gemessen nach der Methode von KINGSLEY (1940). Diese basiert auf der Biuretreaktion. Bei der Präzipitation nach dem α -Verfahren bedeutet der Begriff "Titer" die größtmögliche Antigenverdünnung, bei der noch eine positive Reaktion auftritt. Die Ablesungen der Präzipitate erfolgten nach 15-20 Minuten gegen einen dunklen Hintergrund und bei schräg von hinten einfallendem Licht.

b) Im Agargel nach Ouchterlony

Verwendet wurde REINAGAR der Behringwerke, 1%ig gelöst in physiologischer NaCl. Die Mischung wurde im kochenden Wasserbad erwärmt (ca. 90°C) bis der Agar sich gelöst hatte. Dann wurde auf gut gereinigte, entfettete, Aqua-dest.-gespülte Photoplatten (Format: 10,0 x 2,5 cm) so viel Agarlösung pipettiert, daß eine Agarschicht von 1,0 mm Dicke entstand. Zur Eingrenzung des flüssigen Agars bis zum Festwerden wurden 2 Winkeleisen aus Stahl verwendet. Die Agarplatten kamen bis zum Gebrauch in eine feuchte Kammer. Zur Präzipitation wurden mit einer Stanze Bassins in die Gelschicht geschnitten und die in den Löchern befindlichen Gelpfropfen mit einer Nadel entfernt. Die Bassins wurden aus dem Agar mit Stanzen in einem diagonalen oder rosettenartigen Muster ausgeschnitten, die in den Abbildungen wiedergegeben sind. Die Bassindurchmesser betrugen 6,0 oder 5,0 mm, die Abstände zum mittleren Bassin 4,0 oder 5,0 mm. Im allgemeinen wurden die Antigene in die äußeren und die Antikörper in die mittleren Löcher gegeben. Nach einer Aufbewahrungszeit in der feuchten Kammer von 24 bis 72 Stunden konnten die Ergebnisse abgelesen und auch photographisch festgehalten werden.

c) Immunoелеktrophorese

Die für die Immunoелеktrophorese angewandte Arbeitsweise war die durch SCHEIDEGGER eingeführte Modifikation der von GRABAR u. WILLIAMS beschriebenen Originalmethode. Zur Ausführung der mikro-immuno-елеktrophoretischen Analysen wurde die LKB 6800 A Immuno-елеktrophoreseausrüstung in einem tragenden Medium aus Agar-Gel auf Objekträgern benutzt. Für die eigenen Untersuchungen wurde die von LKB-Produkter-AB Stockholm vorgeschlagene Arbeitsweise übernommen.

Arbeitsmaterial: 1%ige gepufferte Agarlösung: bestehend aus Difco-Spezial-Agar-Noble, destilliertem Wasser und Pufferlösung (0,05-m Natriumdiäthylbarbiturat, 0,01-m Diäthylbarbitursäure, 0,05-m Natriumazetat; pH 8,6) im Verhältnis 1:75:25. Die flüssige Agarlösung wurde auf gut gereinigte, entfettete Objekträger pipettiert, so daß eine ganz gleichmäßige Schicht von 1 mm entstand. Die fertigen Gelplättchen, die sich in Rahmen befanden, wurden bis zu ihrer Verwendung in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Das Ausstanzen der Rinnen und Löcher in die Gelschicht erfolgte mit einem Gel-schneider. Die Loch- und Rinnendurchmesser betrugen 1,0 mm, für den Abstand Loch - Rinne wurde eine Entfernung von 3,0 mm gewählt. Die Löcher waren für die Antigene, die Rinnen für die Antiseren bestimmt. Die Analysen wurden in 2 Hauptarbeitsgängen ausgeführt. Der erste bestand in der elektrophoretischen Auftrennung des Antigens (1 Stunde bei 50 mA und 250 V). Erst danach wurden die Antiseren in die Rinnen gefüllt, und im zweiten Arbeitsgang folgte die immunologische Reaktion. Sie findet statt, wenn die elektrophoretisch aufgetrennten Antigene mit den hinzugegebenen Antikörpern auf Grund der Diffusion im Agargel aufeinander treffen und sichtbare, opalfarbene Präzipitationsbögen bilden. Um bessere Ableseergebnisse zu erzielen, wurden die Präzipitate mit Anidoschwarz 10B oder Lichtgrün - in einigen Fällen zur Feststellung der Lipoproteide

mit Ölrot - angefärbt. Dazu mußte aus dem Gel zunächst das nicht präzipitierte Protein mittels 1%iger NaCl-Lösung ausgewaschen werden. Danach wurden die Plättchen vollständig getrocknet und konnten gefärbt und auch photographisch festgehalten werden.

4. Ergebnisse

a) Vollserum:

Die bei der Immunisierung von 19 Kaninchen mit Blutserumantigenen erhaltenen Ergebnisse gehen aus der Tabelle I hervor: Von diesen 19 Tieren reagierten 7 unspezifisch (37 %), d.h. sie reagierten ebenfalls mit Serumantigenen anderer Tierarten, wenn auch nur bis zu Verdünnungen von höchstens 1:4000. Das Serum dieser Kaninchen wurde nicht für weitere Untersuchungen verwendet. Auffällig war, daß der Titer bei allen Tieren dem homologen Muskelextrakt gegenüber immer wesentlich niedriger war als der gegen das autologe Antigen (Blutserum). Der in Tabelle I gegebene Überblick der spezifisch reagierenden Anti-Serum-Seren bezieht sich auf Untersuchungen nach der UHLENHUTH'schen Methode. Hierbei wurde immer mit einem Eiweißgehalt von 0,1g% im Ausgangsröhrchen begonnen.

Andere Titer und Spezifitäten erhielt man mit der Agargeldiffusionsmethode. Reagierte ein Antiserum bei der Präzipitation im Röhrchen bei einer Antigen-Verdünnung von z.B. 1:64000 noch positiv, so schien es im Agargel bei der Verdünnung von 1:4000 - oder auch weniger - schon negativ.

Aus diesem Grunde erwiesen sich die Antigene bei der Gel-Präzipitation nur unverdünnt angewendet als brauchbar. Dabei zeigte sich, daß die Antiseren, die nach UHLENHUTH präzipitiert absolut spezifisch waren, bei der Methode nach OUCHTERLONY auch mit Serumantigenen verwandter Tierarten reagierten. (Abb.1, 2, 3).

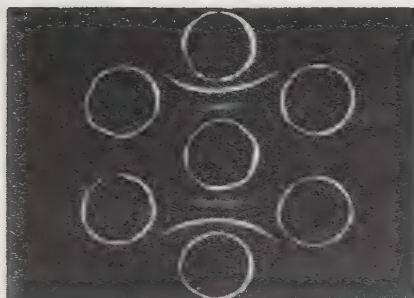
Erklärung der für die verschiedenen Antigene verwendeten Abkürzungen auf den Abbildungen:

PS	- Pferdeserum,	inaktiviert
RS	- Rinderserum,	inaktiviert
SS	- Schweineserum,	inaktiviert
PM	- wässriger Pferdemuskelextrakt	
RM	- wässriger Rindermuskelextrakt	
SM	- wässriger Schweinemuskelextrakt	
SchS	- Schafserum	
HS	- Hundeserum	
aa	- alkohol-gefälltes Antigen	

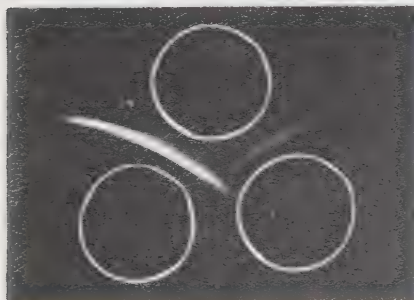
F I - 1. Hauptfraktion aus der Gelfiltration
 F II - 2. Hauptfraktion aus der Gelfiltration
 RS- γ -Rinderserum γ -Globulin, kristallin (Serva-Entwicklungs-
 RS-Alb.-Rinderserumalbumin, kristallin labor
 Heidelberg)

Bei der Numerierung der Stanzmuster erhielt jeweils das oberste Bassin die Ziffer 1, die folgenden wurden fortlaufend im Uhrzeigersinn gekennzeichnet.

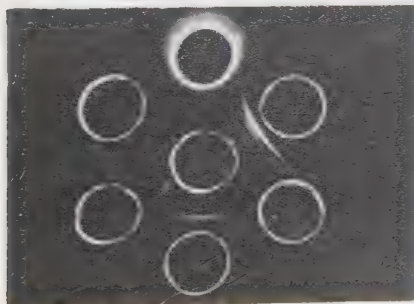
	1		1	
6		2	3	2
	7			
5		3		
	4			



1.)
 1 SS
 2 PS
 3 RS
 4 SS
 5 RS
 6 PS
 7 3131 (Anti-SS-Serum)



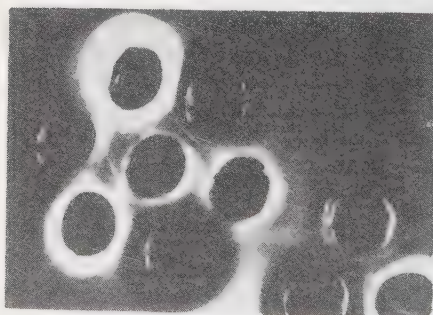
2.)
 1 3131 (Anti-SS-Serum)
 2 SchS
 3 SS



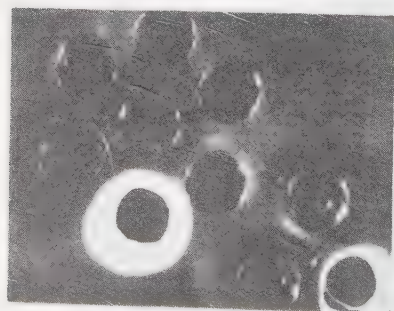
3.)
 1 physiol. NaCl
 2 PS
 3 RS
 4 SS
 5 SchS
 6 HS
 7 3121 (Anti-PS-Serum)

Nach ca. 72 Stunden Aufbewahrungszeit erschienen mehrere Präzipitatsbanden, von denen nur eine bei dem homologen Partner auftrat. Sie war scharf und deutlich ausgeprägt und lag dem Antigenbassin am nächsten. In Richtung auf das Antiserumbassin folgten ihr mehrere meist unscharfe Banden, die nicht nur bei den homologen, sondern auch bei den heterologen Reagenten zu finden waren. Diese einzelnen Banden vereinten sich bei der Rosettenanordnung zu einem "Kreis" um das Antiserumbassin und bildeten an ihren Verbindungspunkten kleine Sporne.

Überprüfte man wässrige Muskelextrakte mit den homologen Antiseren im Agargel, so wurde die Ablesung der meist nur sehr zarten Banden durch helle Trübungshöfe um das Antigenbassin sehr erschwert oder unmöglich. (Abb.4, 5).

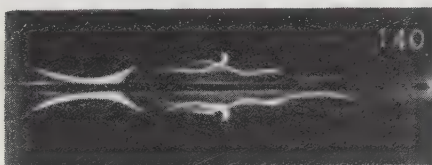


- 4.)
 1 SM
 2 RS
 3 physiol.NaCl
 4 PS
 5 RM
 6 SS
 7 3128 (Anti-RS-Serum)
 1 3128 (Anti-RS-Serum)
 2 RM
 3 SS

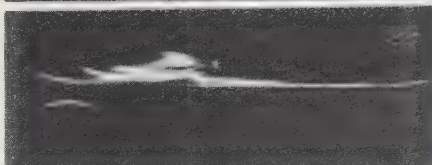


- 5.)
 1 physiol.NaCl
 2 "
 3 "
 4 SM
 5 SS
 6 physiol.NaCl
 7 3132 (Anti-SS-Serum)
 1 3132 (Anti-SS-Serum)
 2 SM
 3 SS

In immunoelektrophoretischen Untersuchungen der im UHLENHUTH-Röhrchen spezifisch gefundenen Anti-Serum-Seren zeigten sich keine Reaktionen mit Serumantigenen anderer Tierarten. Bei der von LKB empfohlenen Versuchsanordnung wanderten die Albumine, die ein schiff-förmiges Präzipitat ergaben, zur Anode nach links. Es folgten ihnen u.a. von links nach rechts die bogenförmigen Präzipitate des α_1 -Lipoproteins, α_2 -Makroglobulins, β -Lipoproteins, Transferrins und schließlich die γ -Globuline (LKB-Produkter AB-Stockholm-Schweden), die zur Kathode wanderten. (Abb.6; Pherogramme: 140, 29, 55, 58, 56).



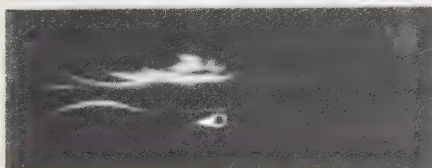
HS
3178 (Anti-HS-Serum)
HS



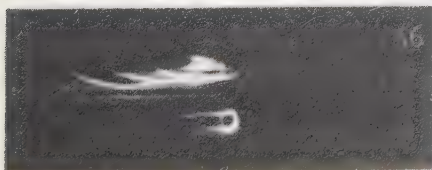
RS
3158 (Anti-RS-Serum)
RM



RS
3159 (Anti-RS-Serum)
RM



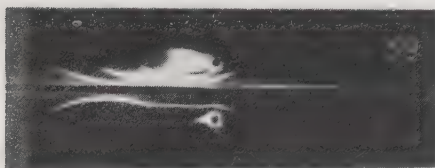
RS
3159 (Anti-RS-Serum)
F I



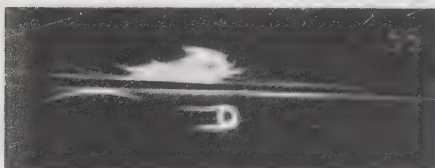
RS
3159 (Anti-RS-Serum)
F II

7 Kaninchen (37 %) mit Tierseren immunisiert waren unspezifisch und wurden aus dem Versuch genommen.

Gegen wässrigen Muskelextrakt präzipitiert, erhielt man nur im Bereich der Albumine ein Präzipitat, das - im Gegensatz zum schiff förmigen Serumalbuminpräzipitat - nur eine einfache, geschwungene Präzipitatslinie darstellte. (Abb. 7; Pherogramme: 59, 55, 54).



RS
3159 (Anti-RS-Serum)
F I



RS
3159 (Anti-RS-Serum)
RM

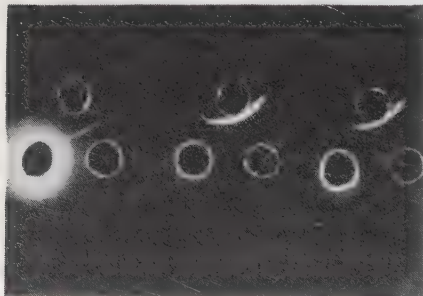


RM
3159 (Anti-RS-Serum)
RS-γ

b) Kristallines Rinderserumalbumin

Von 3 mit Serumalbumin immunisierten Kaninchen erwies sich das Antiserum eines Tieres als spezifisch und konnte für weitere Versuche verwendet werden. Der nach der UILENHUTH'schen Methode ermittelte Titer und die Spezifität sind aus der Tabelle II ersichtlich. Über die Qualität des Antiserums machten jedoch die immunoelektrophoretischen Untersuchungen bessere Aussagen. Sie legten dar, daß es sich um ein Rinderserumalbuminspezifisches Antiserum handelte. Es reagierte im Bereich der Albumine positiv mit Rinder Serum, wässrigem Rindermuskelextrakt, F I und alkoholgefälltem Antigen. Die Formen der Präzipitationsbögen des Anti-Serumalbumin-Serums gegen die Antigene Rinder Serumalbumin und

die ihm in der elektrophoretischen Beweglichkeit entsprechenden Albuminkomponenten des wässrigen Muskel-extrakts und F I zeigten auffällige Unterschiede. Während Serumalbumin ein schifförmiges Präzipitat ergab, bestanden die Präzipitate von albuminartigen Muskeleiweißen nur aus einfachen, mehr oder weniger scharfen, leicht geschwungenen Bögen. (Abb. 8; Pherogramme: 175. 176. 177.



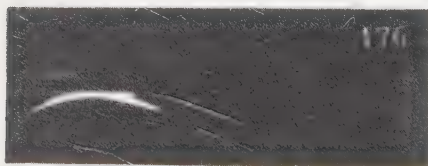
8.)
1 3174 (Anti-RS-Alb.-S.)
2 RS-Alb.
3 F II

1 3174 (Anti-RS-Alb.-S.)
2 RS
3 F I

1 3174 (Anti-RS-Alb.-S.)
2 RS
3 RM



RS
3174 (Anti-RS-Alb.-S.)
RM



aA
3174 (Anti-RS-Alb.-S.)
RS-Alb.



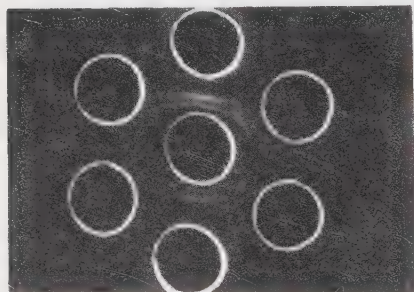
RS- δ
3174 (Anti-RS-Alb.-S.)
F II

c) Ammoniumsulfatgefällte Muskeleiweißfraktionen

Die beschriebene Herstellung von Myogen A nach Baranowski beanspruchte 6 Tage und ergab eine Menge von ca. 200 mg weißem Lyophilisat (Löslichkeit ca. 83%).

Zur Präzipitation wurde es mit physiologischer NaCl aufgenommen und für die UHLENHUTH'sche Methode auf einen Eiweißgehalt von 0,1g% eingestellt. Gegen Anti-Rinderserum präzipitiert, zeigten sich bis zu Verdünnungen von 1:2000 positive Reaktionen; Anti-Pferde- und Anti-Schweineseren hingegen reagierten nicht mit dem Myogen-A.

Für die Agargeldiffusion wurde eine 3%ige Myogen-A-Lösung angesetzt. In Form zweier Banden zeigte sich eine positive Reaktion (Abb. 9).



- 9.)
1 Myogen-A, 3g% Lösg.
2 " , 1:2 verdünnt
3 " , 1:4 "
4 " , 3g% Lösg.
5 " , 1:8 verdünnt
6 " , 1:16 "
7 3128 (Anti-RS-Serum)

Die Immunisierungen mit Myogen A führten zu keinem Erfolg. (Tabelle III).

Durch fraktionierte Ausfällung von wasserlöslichen, nativen Muskeleiweißen mittels gesättigter Ammoniumsulfatlösung waren 5 Fraktionen bei den Sättigungsgraden 30%, 40%, 50%, 60% und 90% gewonnen worden. Die Löslichkeit der Fraktionen war sehr unterschiedlich. F_1 war zu ca. 7%, F_2 zu ca. 8%, F_3 zu ca. 37%, F_4 zu ca. 48% und F_5 zu ca. 59% in physiologischer NaCl löslich. Die Löslichkeit ist insofern wichtig, da man zur Präzipitation nur die gelösten Eiweiße benutzen kann.

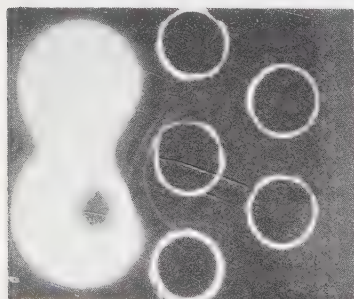
Bei der Präzipitation nach UHLENHUTH ergab sich, daß F_1 und F_2 , die sehr geringe Löslichkeit zeigten, was auch bedeutete, daß die Ausbeute von verwendbarem löslichem Material sehr gering war, mit Anti-Rinder-Serum bis zu einer Verdünnung von maximal 1:4000 spezifisch reagierten. $F_3 - F_5$, mit besserer Löslichkeit, reagierten außerdem mit Anti-Pferde- und Anti-Schweine-Seren positiv:

Tabelle V

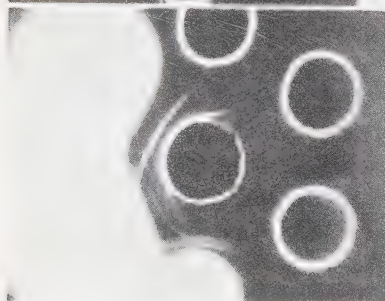
Antiserum	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5
Anti-Pferde-S. 3121	-	-	+++	++	Trübung
Anti-Rinder-S. 3128	+++	++	+++	++++	Trübung
Anti-Schweine-S. 3131	-	-	++	++	Trübung

Im Ouchterlony-Plattentest zeigten F_1 und F_2 keine, und $F_3 - F_5$ mehrere irreguläre Banden, deren Ablesung durch helle Höfe um die Antigenbassins erschwert wurde. (Abb. 10, 11).

Von Immunisierungen mit diesen Fraktionen wurde abgesehen, da sie zu "unrein" schienen, d.h. aus immunologisch differenten Komponenten zusammengesetzt waren.



- 10.)
 1 F_1
 2 F_1
 3 F_2 nach 48-stündiger
 4 F_3 Aufbewahrung
 5 F_4
 6 F_5
 7 3128 (Anti-RS-Serum)



- 11.)
 1 F_1
 2 F_1
 3 F_2 nach 72-stündiger
 4 F_3 Aufbewahrung
 5 F_4
 6 F_5
 7 3128 (Anti-RS-Serum)

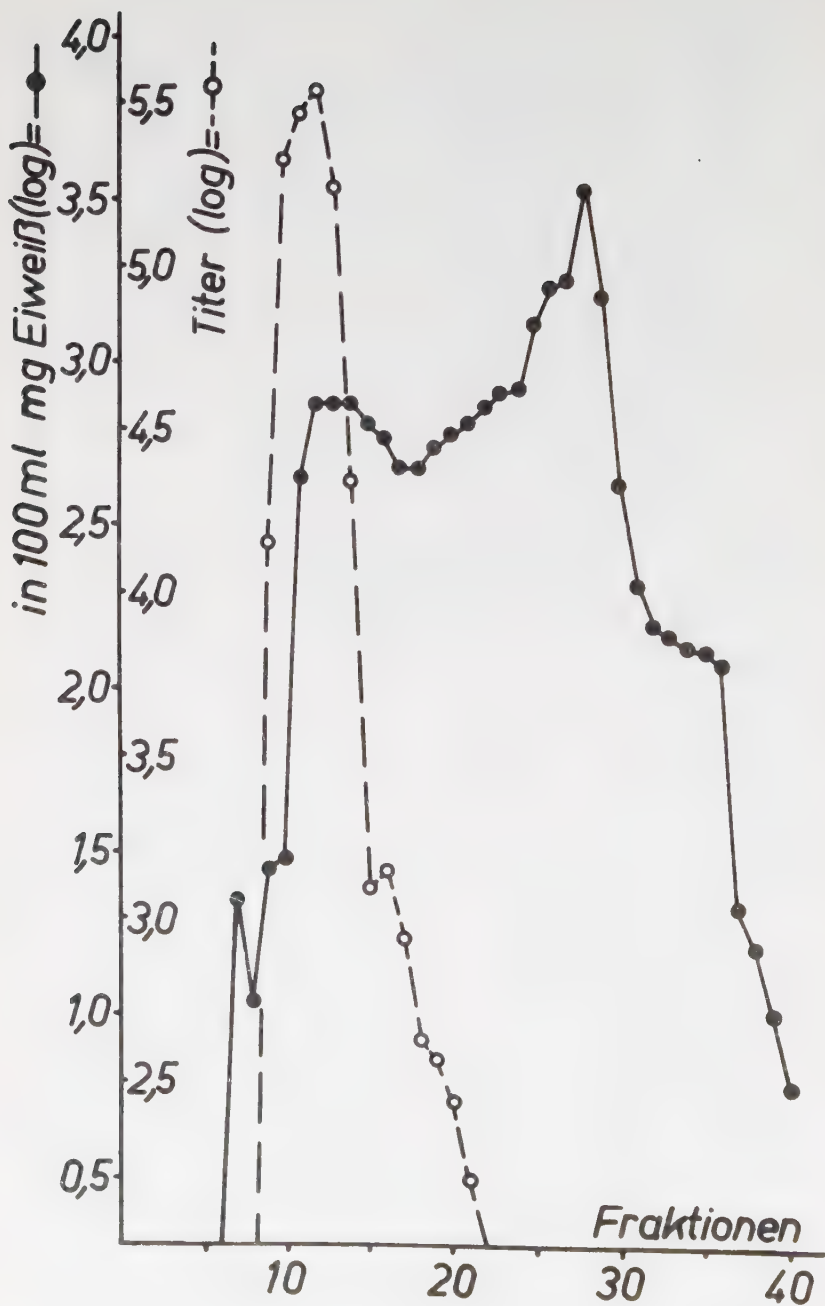
d) Wasserlösliche, native, gelfiltrierte Muskeleiweiße

Insgesamt wurden 17 Fraktionierungen von Muskelextrakt mittels Sephadex-G-75 vorgenommen. Bei jedem der 17 Versuche wurden sämtliche Fraktionen auf ihren Eiweißgehalt, ihre Farbe und ihre antigene Wirkung gegenüber Anti-Rinderserum-Seren untersucht. Da, abgesehen von geringen Schwankungen, die Ergebnisse aller Fraktionierungen gleichartig waren, sollen hier nur beispielhaft die eines Versuches vollständig wiedergegeben werden:

Fraktion	Farbe	Eiweißgehalt in g% (gemessen im Spektralphoto- meter nach der Methode von Lowry)	T i t e r, gegenüber Anti-RS-Se- ren bezogen auf den Eiweißgehalt
6	farblos	--	-
7	"	0,023	-
8	"	0,011	-
9	"	0,028	1: 14300
10	"	0,030	1:212800
11	opaleszierend	0,435	1:294100
12	stark opaleszierend	0,740	1:344800
13	" "	0,743	1:172400
14	" "	0,740	1: 21700
15	" "	0,650	1: 1200
16	" "	0,580	1: 1400
17	opaleszierend	0,465	1: 860
18	"	0,470	1: 420
19	"	0,540	1: 370
20	"	0,590	1: 270
21	"	0,630	-
22	"	0,710	-
23	"	0,775	-
24	"	0,975	-
25	schwach gelblich	1,450	-
26	rosa	1,630	-
27	rot	1,710	-
28	dunkelrot	3,800	-
29	"	1,400	--

Fraktion	Farbe	Eiweißgehalt in g% (gemessen im Spektralphoto- meter nach der Methode von Lowry)	T i t e r, gegenüber Anti-RS-Se- ren bezogen auf den Eiweißgehalt
30	rot	0,400	-
31	rosa	0,200	-
32	schwach gelblich	0,150	-
33	schwach opaleszierend	0,140	-
34	" "	0,130	-
35	farblos	0,125	-
36	"	0,115	-
37	"	0,016	-
38	"	0,010	-
39	"	0,006	-
40	")		-
41	")		-
42	")		-
43	")		-
44	")	aus der Eich-	-
45	")	kurve nicht	-
46	")	mehr ablesbar	-
47	")		-
48	")		-
49	")		-
50	")		-

T a b e l l e IV[illegible]



Bezogen auf den Eiweißgehalt und das Präzipitationsergebnis gegenüber Anti-Rinder-Serum (hierzu verdünnte man die Antigene geometrisch) wurde der Titer der einzelnen Fraktionen errechnet und zusammen mit dem Eiweißgehalt graphisch dargestellt. Alle Fraktionen, die über einschließlich 1:8 verdünnt noch eine positive Präzipitationsreaktion im UHLENHUTH-Röhrchen ergaben, wurden lyophilisiert und im Exsikkator aufbewahrt. Sie waren rein weiß, hatten puffige Konsistenz und wurden mit F I bezeichnet. Für weitere Untersuchungen wurden ebenfalls alle rotgefärbten Fraktionen mit hohem Eiweißgehalt lyophilisiert. Sie erhielten die Bezeichnung F II. Mit den beiden Hauptfraktionen, F I und F II, wurden insgesamt 16 Kaninchen immunisiert. Die Ergebnisse, die sich nur auf Präzipitationsreaktionen nach der UHLENHUTH'schen Methode beziehen, sind in Tabelle IV dargestellt.

Bei den übrigen 16 Fraktionierungen reagierten etwa je 10 Fraktionen (Mittelwert) mit Anti-Rinderserum-Seren positiv. Es handelte sich um die ersten Fraktionen, bei denen ein Eiweißgehalt gemessen werden konnte (immer zwischen F_8 und F_{25}), die anderen gaben keine positive Reaktion. Eine rote Färbung fand sich bei allen Versuchen in maximal 8 Fraktionen (zwischen F_{27} - F_{37}). Bei der Präzipitation im Agargel zeigten die Anti-F I-Seren scharfe Präzipitatsbanden gegen Rinderserum, wässerigen Rindermuskelextrakt und das autologe Antigen (3%ig in physiologischer NaCl gelöst).

Die gleiche Versuchsanordnung mit dem Antigen F II führte nur zur Ausbildung von unklaren Trübungen im Agar.

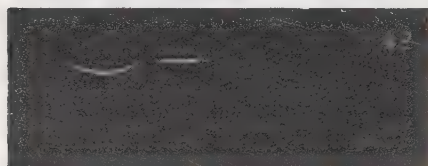
Wiederum aufschlußreiche Ergebnisse brachten die immunoelektrophoretischen Untersuchungen. Es zeigte sich hierbei nämlich, daß alle Anti- F I-Seren, gegen wässerigen Muskelextrakt, Rinderserum, Rinderserumalbumin, Rinderserum- γ -Globulin, F I, F II und alkoholgefälltes Antigen (aA) überprüft, im elektrophoretischen Bereich der Albumine deutlich sichtbare Präzipitate bildeten.

Schifförmige Albuminpräzipitate ergab nur das Serumalbumin.

Zeigten sich bei der Präzipitation von F II und aA überhaupt Präzipitatsbögen, so waren diese äußerst zart und lagen ausschließlich auf der Seite der Kathode. (Abb. 12; Pherogramme: 41, 42, 36, 38, 174).



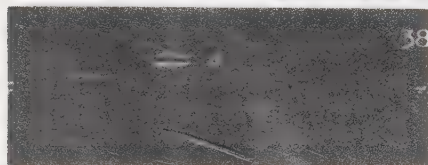
RS
3161 (Anti-FI-Serum)
RM



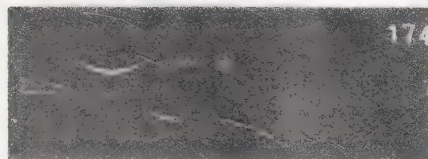
RM
3161 (Anti-FI-Serum)
RS- γ



RS
3160 (Anti-FI-Serum)
RM

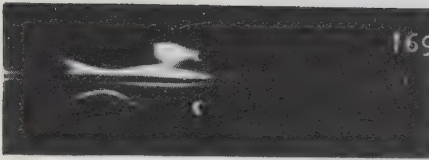


RM
3160 (Anti-FI-Serum)
F I

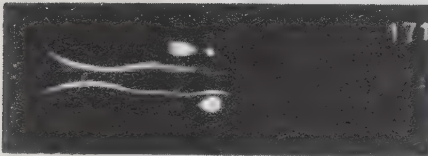


RM
3156 (Anti-FI-Serum)
aA

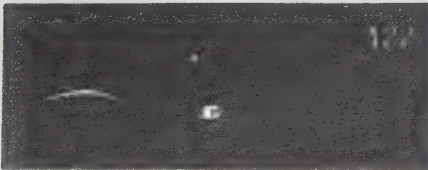
Um die Frage zu klären, ob die Albuminkomponenten der Anti- F I-Seren immunologisch gleich mit dem Anti-Serumalbumin seien, wurden zu je 1,0 ml Antiserum 100 Mikrogramm, 200 Mikrogramm, 400 Mikrogramm und 20 mg kristallines Serumalbumin gegeben, um auf diesem Wege eine stufenweise Absättigung zu erzielen. (Abb. 13; Pherogramme: 169, 171, 122, 120, 117, 164, 110, 111).



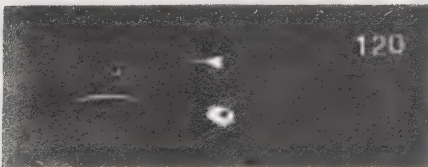
13.)
RS (Anti-FI-Serum)
3161 (u.100 Mikrogramm
RM RS-Alb.)



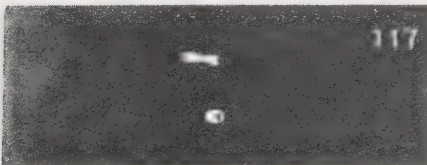
RS (Anti-FI-Serum)
3161 (u.100 Mikrogramm
FI RS-Alb.)



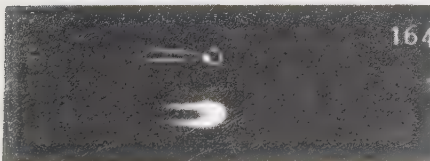
FII (Anti-FI-Serum)
3161 (u.100 Mikrogramm
FI RS-Alb.)



RS (Anti-FI-Serum)
3161 (u.200 Mikrogramm
FI RS-Alb.)



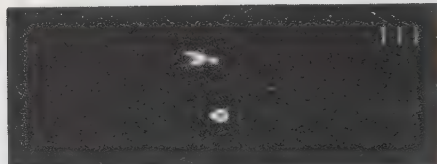
RS (Anti-FI-Serum)
3161 (u.400 Mikrogramm
FI RS-Alb.)



FII (Anti-FI-Serum)
3161 (u.400 Mikrogramm
FI RS-Alb.)



RS (Anti-FI-Serum)
3161 (u.20 mg RS-Alb.)
F I



RS (Anti-FI-Serum)
3161 (u.20 mg RS-Alb.)
RM

Die Abbildungen zeigen, daß mit einer Menge von 400 Mikrogramm sämtliche Antikörper gegen albuminartige Eiweiße aus 1,0 ml Antiserum abgesättigt werden konnten. Zur Absicherung der oben beschriebenen Präzipitationsergebnisse der fraktionierten Muskeleiweiße gegen Anti-Rinder-Muskeleiweiß-Seren wurde ein weiterer Versuch mit Anti-aA-Seren (durch Immunisierung mit alkoholgefällten Rinder-Muskeleiweißen gewonnen) angestellt. Die Präzipitation nach der UHLENHUTH'schen Methode führte zu den in Tabelle VI dargestellten Ergebnissen.

F II, das bei der Präzipitation gegen Anti-Serum-Seren, Anti-F I-Seren und auch bei der Immunisierung inaktiv schien, reagierte mit den Anti-aA-Seren positiv.

Tabelle VI

Kanin- chen Nr.	An- ti- gen	Rinder- serum	Rind.- Musk.- Extr.	T i t e r			
				Alkohol- gefäll- tes Anti- gen "aA" (Rind)	F I	Krist. Serum- Albu- min (Rind)	F II
191	aA	1:64000	1:16000	1:22700	1:64000	1:256000	1:128000
192		1:32000	1: 8000	1:22700	1:32000	1:128000	1: 32000

Abb. 14; Pherogramm: 173.



RM
192 (Anti-aA-Serum)
aA

Bei der Immunelektrophorese des alkoholgefällten Muskeleiweißes und seines homologen Antiserums (Nr. 192) konnte festgestellt werden, daß die Antigenlösung bei einem Eiweißgehalt von 0,2 g% einen deutlichen Präzipitationsbogen nur im Bereich der Globuline ergab. Die Untersuchungen mit dem Anti-aA-Serum wurden in dieser Arbeit jedoch nicht fortgesetzt, da sie über den Rahmen der vorliegenden Fragestellung hinausführen.

IV. Diskussion

1. Zur Fraktionierung nativer, wasserlöslicher Muskelproteine

Erstes Ziel der vorliegenden Untersuchungen sollte es sein, verschiedene, möglichst unveränderte Muskeleiweißkörper für Immunisierungszwecke zu isolieren.

Da das Aussalzen mit Ammoniumsulfat eine gute Fraktionierungsmethode für Proteine sein sollte, wurde diese Art der Trennung auch bei ersten eigenen Experimenten angewendet.

Allerdings erwies sich die Methode entgegen den von COHN u. Mitarb. (1940) und BEISENHERZ u. Mitarb. (1953) veröffentlichten guten Erfolgen bei Fraktionierungen von Serumproteinen und Muskeleiweißen, als wenig vorteilhaft für die eigenen Versuche. Obwohl es günstig war, daß derartige Aussalzungen keine kostspielige, spezielle Ausrüstung erfordern, und die Versuche leicht durchzuführen sind, mußte festgestellt werden, daß die Gewinnung immunologisch einheitlicher Fraktionen mit einfachen Ammoniumsulfataussalzungen nicht möglich war. Diese Ergebnisse stimmen mit denen überein, die von MC MEEKIN (1946), PETERSEN (1945) und OKATA u. SATO (1963) berichtet wurden.

GOODMAN (1963) und LESKOWITZ (1963) konnten eine befriedigende Isolierung durch anschließende Reinigung der Fällungsprodukte erzielen, andererseits wurde aber beschrieben, daß es auch durch mehrmaliges Umfällen nicht möglich sei, absolut einheitliche Eiweißkörper zu erhalten (HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, 1960). Bei der Zielsetzung in den eigenen Versuchen schienen daher weitere Experimente mit dieser Methode wenig sinnvoll.

Bessere Ergebnisse versprach die chromatographische Trennung, die - wie FLODIN (1962) und PETERSON u. SOBER (1954) zum Ausdruck brachten - große Vorzüge für präparative und analytische Zwecke hat. Besonders für die Zerlegung komplizierter Gemische chemisch verwandter Stoffe erwies sie sich als vorteilhaft. Diese Ansicht

wurde von RHODES u.Mitarb. (1958) und MANDELES (1960) bestätigt. Als besonderer Vorzug wurde hervorgehoben, daß nicht nur verhältnismäßig große Proteinnengen binnen sehr kurzer Frist scharf separiert werden können, sondern daß dies auch unter außerordentlich schonenden Bedingungen geschieht.

Die eigenen Versuche bestätigen diese Vorzüge. Die aus wässerigen Muskelextrakten isolierten Proteinfractionen waren deutlich voneinander unterschieden. Die Fraktionierung ließ sich soweit treiben, daß die Gewinnung serologisch in sich einheitlich reagierender Proteine möglich wurde. Damit erwies sich die Gelfiltration gegenüber dem Aussalzungsverfahren erneut als klar überlegen.

Auf Grund des siebähnlichen Effektes, den das Dextran-Gel ausübt, erfolgt bei Stoffgemischen eine Fraktionierung nach der Molekülgröße der einzelnen Komponenten. Läßt man in einem derartigen Stoffgemisch eine Vergleichssubstanz bekannten Molekulargewichtes mitlaufen, so kann man nach ANDREW (1964) unter kontrollierten Bedingungen die Molekulargewichte auch der übrigen Fraktionen des Eluates - zumindest der Größenordnung nach bestimmen. In den eigenen Versuchen erfolgte dies nicht zahlenmäßig, sondern nur orientierend. Als "Vergleichssubstanz" diente hierbei die ganz scharf geschnittene myoglobinhaltige Fraktion, die während des ganzen Trennungsvorganges wegen ihrer leuchtenden Rotfärbung bereits visuell lokalisiert werden konnte.

2. Immunisierungserfolge bei verschiedenen Injektionsmodi

Hinsichtlich der Wahl des Injektionsmodus bestätigte sich die Auffassung von UHLENHUTH und SEIFFERT (1930), die die intravenöse Injektion für die einfachste und wirksamste hielten. Das Freund'sche Adjuvans, das EISNER (1959), RUCKLI (1962) und auch GUINEE und WILLEMS (1962) mit gutem Erfolg angewendet hatten, zeigte dagegen

bei den eigenen Untersuchungen keine besonderen Vorzüge, weder was den Titer und die Spezifität der Antiseren noch was die Immunisierungsdauer betrifft. (s. auch Tabelle IV). Namentlich was die Spezifität der Antiseren angeht, konnte irgendeine Abhängigkeit von dem jeweiligen Immunisierungsmodus nicht festgestellt werden.

3. Zu den Präzipitationsmethoden

Die von UHLENHUTH (1901) eingeführte Präzipitationsmethode im Röhrchen ermöglichte auch in den eigenen Versuchen in Form des von DEAN und WEBB (1926) entwickelten sogenannten α -Verfahrens eine besonders einfache quantitative Ermittlung des Antikörpergehaltes der präzipitierenden Seren. Als weniger zweckmäßig erwies sich die Röhrchenmethode allerdings dann, wenn es darauf ankam, festzustellen, welche und wie viele Komponenten in den Antigen-Antikörperlösungen miteinander reagierten. Die serologische Aktivität der einzelnen Eiweißkörper in einem Gemisch war nicht zu prüfen, denn die Uhlenhuth'sche Methode sagt nur alternativ aus, ob in den untersuchten Systemen präzipitierende Antikörper und mit diesen reagierende Antigene vorhanden sind. Für eine weitergehende Differenzierung müssen Arbeitsweisen gewählt werden, bei denen die einzelnen Eiweiße in getrennt erscheinenden Banden präzipitiert werden. Dazu gehören die Präzipitationen im Agargel wie die Doppeldiffusion und die Immunoelektrophorese.

Das OUCHTERLONY-Verfahren gestattet eine umfassendere Bestimmung der einzelnen Bestandteile der Eiweißlösungen als die Röhrchenmethode, weil eine begrenzte Aussage über die Anzahl der Reagenten gemacht werden kann (VORLAENDER und ROSS, 1961; HITZIG, 1963 und WEIGEL u. MC CONAHEY, 1962). Jedoch ist für eine einwandfreie Differenzierung die genaue Kenntnis der Diffusionsgeschwindigkeiten (Mol.-Gew.) und der Konzentrationen der einzelnen Komponenten notwendig. Ähnliche Einschränkungen sind auch von SCHWICK und STÖRIKO (1964), DARCY (1960) und VORLAENDER und ROSS (1961) dargelegt worden. Bei der Frage-

stellung der eigenen Arbeit befriedigte deshalb diese Methode nicht, weil zur Auswertung der Präzipitatbänden jeweils die Diffusionsgeschwindigkeiten und die Konzentrationen der Reagenten hätten bekannt sein müssen. Aus diesem Grunde war die Identifizierung aller Präzipitatbänden auf Grund ihrer Lokalisation nicht immer möglich. In quantitativer Hinsicht ist die Agargelddiffusion weniger empfindlich als die Röhrchenmethode. Diese Tatsache beruht auf diffusionsmechanischen Gründen, worauf auch CROWLE (1958) hinwies.

Die von OUCHTERLONY (1949) und vielen anderen Autoren betonte Leistungsfähigkeit der Diffusionsmethode bestätigte sich auch bei den eigenen Versuchen. So reagierten nach 48- bis 72-stündiger Aufbewahrungszeit Antiseren, die im Röhrchen absolut spezifisch erschienen, im Agargel mit artfremden Antigenen. Diese Erscheinung wurde auch von ROULET und Mitarb. (1960) beschrieben und dürfte mit von diesen Verfassern bei verschiedenen Tierarten nachgewiesenen gemeinsamen Antigendeterminanten zu erklären sein.

Trotz verschiedener Vorzüge zeigte die Präzipitation im Gel einen Nachteil bei der Untersuchung von Fleischauszügen. Zwar konnten spezifische Präzipitate erzeugt werden, wie sie bereits SCHEIBNER (1960), VAN DEN HEEVER (1962), BUBLOZ (1962) und HAY (1962) beschrieben, oft erschienen jedoch helle Höfe um die Bassins, die die Banden kaum erkennen ließen und die Dokumentation der Gelplatten sehr erschwerten.

Die elektrophoretische Beweglichkeit, die weitgehend unabhängig von der Molekülgröße und von der Konzentration ist, ermöglicht eine wesentlich differenziertere Trennung. Auch für immunologische Untersuchungen hat diese Methode große Vorzüge (WILLIAMS und GRABAR (1953), GRABAR und BURTIN (1960) und SCHEIDEGGER (1955)). Mit den von GÖTZ (1957) empfohlenen Färbemethoden konnten auch in den eigenen Präparaten die zartesten Präzipita-

tionsbögen sichtbar gemacht werden, so daß von allen angewendeten Methoden die Immunoelktrophorese die detaillierteste Aussage über die Qualität, d.h. Zusammensetzung und "Reinheit", der Antigene und Antiseren machte. Diese Versuchsergebnisse bestätigten die Ausführungen von KOLTAY (1960), ROULET und Mitarb. (1961), HIRSCHFELD (1962) und FEY (1964).

4. Identifizierung der nativen, wasserlöslichen Muskel-eiweiße aus den eigenen Versuchen

In wässerigen Muskelextrakten sollen nach GRAU (1960) hauptsächlich albuminartige Eiweißkörper enthalten sein. Der Anteil der Fraktionen, die bei einem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigungsgrad über 50% ausgefällt werden, müßte also der überwiegende sein. Die gute Löslichkeit der Fraktionen F_4 (60% Sättigungsgrad) und F_5 (90% Sättigungsgrad) aus den eigenen Auftrennungen ließen daher die Annahme zu, daß sie überwiegend albuminartige Eiweiße enthielten. Da aber alle Fraktionen nach den Ergebnissen des Ouchterlony-Plattentestes stets aus mehreren serologisch differnten Eiweißgruppen zusammengesetzt waren, konnten sie für die Immunisierungszwecke, für die sie vorgesehen waren, nicht geeignet sein.

Von den mit der Gelfiltration gewonnenen Fraktionen schienen zwei Hauptgruppen, F I und F II, hinsichtlich ihrer in eigenen Versuchen ermittelten Charakteristika (Eiweißgehalt, Farbe, immunologische Eigenschaften), deutlich voneinander unterschieden. Da die Trennung mittels SEPHADEX nach dem Molekulargewicht der Proteine erfolgt, was u.a. FLODIN (1962) und PORATH u. FLODIN (1963) bewiesen hatten, konnte aus den eigenen Experimenten folgende Schlußfolgerung gezogen werden: F I mußte von allen wasserlöslichen Muskelproteinen das höchste Molekulargewicht haben, denn es war das erste Eiweiß, das bei der Fraktionierung eluiert worden war. In den verschiedenen Präzipitationsmethoden zeigte es die Eigenschaften albuminartiger Eiweißkörper.

Nach den Angaben in der Literatur sind in wässrigen Muskelextrakten Myoalbumin, Myogen und Myoglobin (MEYER u. WEBER, 1933) oder nur albuminartiges, wasserlösliches Myogen und Myoglobin (GRAU, 1960) zu erwarten. Übereinstimmend schrieben BOSCH (1951) und GRAU, daß die Anteile von Myogen ca. 20% und von Myoglobin ca. 0,6% am Gesamtmuskeleiweiß betragen. Bei der Gel-Filtration von 10,0 ml Extrakt betrug in den eigenen Versuchen der Anteil von F I 4,62g%, wohingegen F II 10,39g% (beides Mittelwerte) ausmachte und wegen der sichtbaren roten Färbung Myoglobin enthalten mußte. Wenn die in der Literatur angegebenen Anteile von 20% Myogen und nur 0,6% Myoglobin am Gesamtprotein zu Grunde gelegt werden, kommt man zu dem Schluß, daß in F II zusammen mit dem Myoglobin noch weitere Eiweiße mit annähernd dem gleichen Molekulargewicht eluiert wurden.

Die Elektrophorese und die Präzipitation hatten den albuminartigen Charakter von F I erwiesen. Die zur Kathode wandernden Proteine ergaben hingegen nur äußerst zarte oder gar keine Präzipitationsbögen und konnten deshalb nicht identifiziert werden. Dies war besonders auch deshalb nicht möglich, weil die myoglobinhaltige Fraktion F II bei der Immunisierung auch zu hohen Dosen keine nachweisbare Antikörperbildung verursachte. Dies Ergebnis steht im Gegensatz zu den Angaben von KESZTYÜS u. VARTERESZ (1945), die spezifische Anti-Myoglobin-Seren mit hohem Titer herstellen konnten. Allerdings fehlten in ihrer Arbeit Angaben über die Höhe der angewendeten Dosis, so daß noch die Möglichkeit besteht, mit wesentlich höheren Dosen erfolgreicher zu immunisieren. Um eine endgültige Aussage treffen zu können, bedarf es deshalb weiterer Untersuchungen.

Ein interessanter Anknüpfungspunkt kann dabei die positive Reaktion von F II mit den Antiseren aus alkoholgefällten Muskeleiweißen sein. Nach einem Vergleich mit den Präzipitationsergebnissen der Anti-F I-Seren müßte man folgern, daß das alkoholgefällte Eiweiß eine oder

mehrere Proteinkomponenten enthält, die in F I fehlen oder in zu geringer Konzentration vorhanden sind. Auch theoretisch wäre das zu fordern, da die Fraktionierung mittels Gelfiltration zweifellos ein schärferes Trennverfahren darstellt als die Alkoholfällung.

Gegenüber F II konnte durch die angeführten Immunisierungserfolge eine wesentlich größere immunologische Aktivität der Muskeleiweißkörper bei F I festgestellt werden. F I hatte bei den immunologischen Untersuchungen überwiegend Präzipitate im Bereich des Serumalbumins erzeugt. Das gleiche Ergebnis erbrachten die Reaktionen der Anti-F I-Seren, deren hoher Gehalt an Antikörpern gegen albuminartige Eiweißkörper auffallend war.

Diese Antikörper ließen sich durch kristallines Serumalbumin absättigen. Daher lag die Frage nahe, ob die Hauptfraktion F I mit Serumalbumin identisch ist, oder ob es sich um differente Proteine handelt, die lediglich in ihren immunologischen Eigenschaften übereinstimmen. UHLENHUTH (1901), BUBLOZ (1962) sowie auch DURAND und SCHNEIDER (1962) vertraten die Meinung, daß die Präzipitationsreaktionen von wässrigen Muskelextrakten auf Serumbestandteile zurückzuführen seien. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten diese Auffassung nicht widerlegen. Doch schien es unwahrscheinlich, daß Serumbestandteile einen so relativ hohen Anteil der wasserlöslichen Muskeleiweiße darstellen sollten, besonders wenn man die Angaben von HANSARD (1956) berücksichtigt. Danach bleiben bei ordnungsmäßiger Schlachtung nur 10 µl Restblut pro Gramm im Muskelfleisch zurück. Weiterhin könnte auch die auffallend andere Form der Serumalbumin-Präzipitatbögen und der entsprechenden F I-Fraktion ein Hinweis auf strukturelle Unterschiede beider Eiweißkörper sein (vgl. Abb. 169). Mit den verschiedenen Präzipitationsmethoden waren solche Unterschiede jedoch nicht zu erfassen.

Abweichende Bogenformen können auch durch unterschiedliche Eiweißkonzentrationen der Antigenlösungen bedingt sein. Diese Deutung hat hier allerdings wenig für sich, da die Konzentrationsdifferenzen nur gering waren (Serumalbumin ca. 3,5g%, F I ca. 2-3g%).

Von allen fraktionierten und untersuchten wasserlöslichen Muskeleiweißen hatte bei den eigenen Versuchen die albuminartige Komponente die beste immunologische Wirkung. Mit einer niedrigen Gesamtdosis (85,0 - 145,0 mg) konnten auch bei unterschiedlichem Injektionsmodus spezifische Antiseren mit hohem Titer erzeugt werden, wohingegen Immunisierungsversuche mit anderen Eiweißfraktionen (F II) desselben Extraktes auch bei doppelt so hoher Dosis keine Erfolge zeigten.

Die immunologische Aktivität der einzelnen Eiweißkörper in wässrigen Muskelextrakten ist also außerordentlich unterschiedlich. Möglicherweise gelingt es mittels weiterer Fraktionierungsverfahren und nach entsprechend starker Anreicherung, noch andere wasserlösliche Muskelproteine zu isolieren, die ebenfalls eine Antikörperbildung provozieren. In methodischer Hinsicht könnten die vorliegenden Ergebnisse hierfür einen Ansatz bieten.

V. Schlußfolgerung

Anti-Serum-Seren präzipitierten das homologe Serumantigen stets mit einem viel höheren Titer als Muskelextrakte der gleichen Tierart. Dadurch haben die Antiseren, die zum Nachweis tierartspezifischer Proteine in Fleisch und Fleischwaren Verwendung finden sollen, oft einen zu niedrigen Titer gegen diese Antigene.

In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb die immunologischen Eigenschaften einzelner, fraktionierter, wasserlöslicher Muskeleiweiße untersucht und durch entsprechende Immunisierungen die Gewinnung spezifischer Anti-Muskereiweiß-Seren versucht werden.

Bei der Isolierung einzelner Muskeleiweißfraktionen aus wässrigen Extrakten zeichnete sich in der beschriebenen Versuchsanordnung nur eine Komponente durch immunologische Aktivität aus. Sie bestand aus einem albuminartigen Eiweiß, das in seinen serologischen Eigenschaften eine auffallende Ähnlichkeit mit dem Serumalbumin aufwies. Andere Eiweißfraktionen - mit niedrigerem Molekulargewicht - wurden zwar auch durch Anti-Muskereiweiß-Seren (Anti-aA-Seren) gefällt, aber wenn sie als Antigen zur Immunisierung verwendet wurden, gelang es auch bei hoher Dosierung nicht die Bildung von Antikörpern zu provozieren.

Die immunologische Wirkung der einzelnen Eiweißbestandteile wässriger Muskelauszüge ist also sehr unterschiedlich. Zweifellos stimulieren die albuminartigen Eiweiße die Antikörperbildung am stärksten. Damit erklärt sich auch das Phänomen, daß es durch eine Immunisierung mit Serumantigenen stets leichter gelingt, Seren mit einem hohen Antikörpertiter zu produzieren, als es mit wässrigen Muskelextrakten möglich ist. Diese Erscheinung wurde bisher bei allen Immunisierungen beobachtet. Man darf sie auf Grund der vorliegenden Ergebnisse damit deuten, daß die Albumine im Serum stets einen höheren Anteil des gelösten Eiweißes darstellen als in wässrigen Muskelextrakten.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß auch von den übrigen wasserlöslichen Eiweißen der Muskulatur antigene Wirkungen ausgehen, obgleich die vorliegenden Ergebnisse dagegen sprechen. Jedenfalls müßten dann die Dosierungen ein Vielfaches von dem betragen, was hier bei den albuminartigen Eiweißkörpern eingesetzt wurde.

VI. Zusammenfassung

Die Immunisierung mit Muskelextrakten führt nur selten zur Bildung spezifischer und hochtitriger Antisera. Darum sollten in der vorliegenden Arbeit die immunologischen Eigenschaften einiger wasserlöslicher Muskeleiweißfraktionen näher untersucht werden. Die Fraktionierungsversuche führten zu dem Schluß, daß wässrige Muskelextrakte aus einer Reihe immunologisch differenter Fraktionen bestehen, deren Separation mittels Gelfiltration möglich ist.

Bei Immunisierungsversuchen konnte nur eine Hauptfraktion die Bildung von Antikörpern in nachweisbarem Maße hervorrufen. Hierbei handelte es sich um ein Protein, das sich auf Grund immunoelektrophoretischer Untersuchungen und kreuzweiser Absättigungsversuche als - zumindest in immunologischer Hinsicht - identisch mit Serumalbumin erwies. Die Immunisierung mit diesem Antigen erbrachte in kurzer Zeit und bei niedriger Dosis hochspezifische Antisera, was als ein Vorteil gegenüber den von anderen Autoren beschriebenen Immunisierungen mit nativen, hitzeoagulierten oder alkoholgefällten Muskeleiweißen anzusehen ist. Da die so gewonnenen Antisera jedoch den höchsten Titer gegenüber Serumantigenen und nicht gegenüber Muskeleiweißen zeigten, kann es sich bei dieser Fraktion nicht um einen im engeren Sinne muskelgewebeeigenen Eiweißkörper handeln. Eine zweite niedriger molekulare Hauptfraktion ließ zwar bei der Immunisierung trotz hoher Dosierung keine antigenen Effekte erkennen, wurde aber selbst durch Antisera, die aus alkoholgefällten Muskeleiweißen gewonnen worden waren, gefällt.

Daraus war zu schließen, daß auch bei den übrigen, nicht albuminartigen, wasserlöslichen Muskelproteinen antigene Eigenschaften vermutet werden können. Zur Identifizierung dieser Eiweißkörper und zum Nachweis möglicher Antigenwirkungen bedarf es weiterer Fraktionierungen und einer besonderen Anreicherung der fraglichen Eiweiße.

VII. L i t e r a t u r

- 1 Aly, F.W., G. Brinker,
H. Cleave, H. Deicher,
F. Hartmann u. W. Nix (1961): Die Bestimmung der Haptoglobulin-
Gruppen mit Hilfe einfacher
immunbiologischer Methoden
klin.Wschr.39,610
- 2 Andrew, P. (1964): Estimation of the molecular
weights of proteins by
SEPHADEX gel-filtration
Biochem.J.91,222
- 3 Arrhenius, S. (1907): Immunochemie
Akad.Verlagsges.,Leipzig
- 4 Baranowski, T. (1939): Die Isolierung von kristalli-
sierten Proteinen aus Kanin-
chenmuskulatur
Hoppe-Seyler's Zschr.
physiol.Chem.260,43
- 5 Bechhold, H. (1905): Strukturbildung in Gallerten
Zschr.physiol.Chem.52,185
- 6 Beisenherz, G.,
H.J. Boltze, Th. Bücher,
R. Czok, K.H. Garbade,
E. Meyer-Arendt, u.
G. Pfeleiderer (1953): Diphosphofructose-Aldolase,
Phosphoglyceraldehyd-Dehydro-
genase, Milchsäure-Dehydroge-
nase, Glycerophosphat-Dehydro-
genase und Pyruvat-Kinase aus
Kaninchenmuskulatur in einem
Arbeitsgang
Zschr.Naturforsch.8 b,555
- 7 Bill, A., N. Marsden u.
H.R. Ulfendahl (1960): Some applications of a new gel
filtration method for molecu-
lar separation
Scand.J.Clin.Laborat.Invest.
12,392
- 8 Björklund, B. (1954): Quantitative analysis of gel
precipitates with the aid of
chemical colour reactions
Proc.Soc.Exper.Biol.85,438
- 9 Bosch, M.W. (1951): Bijdrage tot de karakterisering
van spieren door electrophorese
Scheltema - Holkema, Amsterdam
- 10 Bubloz, A. (1962): Beitrag zum Nachweis der Ver-
fälschung von Fleischwaren mit
Pferdefleisch. Anwendung der
Doppel-Diffusions-Methode im
Gel (Ouchterlony)
Zbl.Vet.med.2,961

- 11 Brown, W.D.,
M.Martinez,
M. Johnstone u.
H.S. Olcott (1962): Comparative biochemistry of
myoglobin
J.Biol.chem.237,81
- 12 Cohn, E.J., T.L.Mc Meekin,
J.L. Oncley, J.M. Newell
u. W.L. Hughes (1940): Preparation and properties of
serum and plasma proteine
J.Amer.chem.Soc.62,3386
- 13 Crowle, A. (1958): A simplified micro double-diffu-
sion agar precipitin technique
J.Laborat.Clin.Med.52,784
- 14 Derselbe (1961): Immunodiffusion
Acad.Press, New York and London
- 15 Darcy, D.A. (1960): A quantitative Application of the
agar-Diffusion plate: the estima-
tion of specific proteins in
serum
Immunology 3,325
- 16 Dean, H.R. u.
R.A. Webb (1926): The influence of the optimal pro-
portions of antigen and antibody
in the serum precipitation reac-
tion
J.Path.bact.29,473
- 17 Drosdow, N.S. (1954): Praktischer Leitfaden durch die
Biochemie des Fleisches
Akad.Verl.Berlin
- 18 Dold, H. (1911): Über die Giftigkeit von wässerig-
en Organextrakten
Zschr.Immunit.forsch.10,53
- 19 Durand, M. u.
R. Schneider (1962,I): Relations antigénique de diverses
espèces de mammifères par l'étude
de l'immuno-électrophorèse leur
serum sanguin
Arch.Inst.Pasteur Tunis 39,137
- 20 Dieselben (1962,II): Immuno-électrophorèse des jus
de viande et son application dans
la détection des fraudes
Arch.Inst.Pasteur Tunis 39,153
- 21 Edelbacher, S. u.
F. Leuthard (1957): Lehrbuch der physiologischen
Chemie
de Gruyter, Berlin
- 22 Eisner, M. (1959): Verwendung von Adjuvantien zur
Gewinnung von Antikörpern gegen
das Kapselpolypeptid des Bacillus
anthracis
Schweiz.Zschr.allg.Path.Suppl.
22,129

- 23 Fey, H. (1964): Immunologische, serologische und immunochemische Methoden zum Nachweis der Agammaglobulinämie des Kalbes
Zbl.Vet.med. 11, 584
- 24 Finger, H. (1961): Versuch einer Darstellung der Wirkungsweise des Freund'schen Adjuvans
Zschr.Immunit.forsch. 122, 15
- 25 Flodin, P. (1962): Dextran gels and their applications in gel filtration
Diss.Uppsala
- 26 Flodin, P. u.
J. Killander (1962): Fractionation of human serum proteins by gel filtration
Biochim.biophysica acta 63, 403
- 27 Freund, J. u. K.
Mc Dermott (1942): Sensitization to horse serum by means of adjuvants
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 49, 548
- 28 Fornet, W. u.
M. Müller (1910): Praktische und theoretische Präzipitationsuntersuchungen
Zschr.Hyg. 66, 215
- 29 Friedberger, E. u.
A. Collier (1919): Über heterogenetische Antigene und Antikörper
Zschr.Immunit.forsch. 28, 237
- 30 Fudjiwara, K. (1922): Kochkoaguliertes Serum als Präzipitinogen
Dtsch.Zschr.gerichtl.Med. 1, 562
- 31 Gillert, K.-E. (1962): Die Immunoelktrophorese als diagnostische Methode
Dtsch.med.J. 13, 687
- 32 Gotz, H. (1957): Methodische Grundlagen der Immunoelktrophorese
Zschr.Immunit.forsch. 114, 72
- 33 Goodman, J.W. u.
D. Gross (1963): Studies on fragments of rabbit -globulin
J.Immunol. 90, 864
- 34 Grabar, P. u.
P. Burtin (1960): Analyse immuno-électrophorétique
Mason, Paris
- 35 Grau, R. (1960): Fleisch und Fleischwaren
Hayn, Berlin

- 36 Guinée, P.A.M. u.
H.M.C. Willems (1962): Studies on the biological determination of heat denaturated muscle proteins by means of precipitations tests
Proc.3.Symposium of the World Ass. Vet.Food Hyg.,Nice;S.34
- 37 Hansard, S.L. (1956): In "Blood and other body fluids"; Federation of American Societies for Experimental Biologie;
Proc.Soc.Exper.Biol.med.91,31
- 38 Hanson, L.A. u.
B.G. Johansson (1960): Presence of immunologically active fragments after proteolytic degradation of human -globulin
Nature 187,599
- 39 Hay, D. (1962): Identification of the origin of animal protein by agar-gel diffusion
Nature 196,995
- 40 Heever, L.W.van den
(1962): Serological identification of meat from different species by the agar gel diffusion method
J.S.Afr.Vet.med.Ass.33,215
- 41 Hirschfeld, J. (1960): Immunoelktrophoresis - procedure and its application to the study of group-specific variations in sera
Sci.Tools 7,18
- 42 Derselbe (1962): The use of immunoelktrophoresis in the analysis of normal sera and in studies of the inheritance of certain serum proteins
Sci.Tools 8,17
- 43 Hitzig, W.H. (1963): Agarpräzipitationsmethoden in der klinischen Medizin
Ärztli.Laborat.9,87
- 44 Hoppe-Seyler, F. u.
H. Thierfelder (1960): Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse
Bd.4,T.1,S.496
Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg
- 45 Jacob, J.J.C. (1947): The electrophoretic analysis of protein extracts from striated rabbit muscle
Biochem.J.41,83

- 46 Julianelle, L.A. (1930): Reactions of rabbits to intra-cutaneous injections of pneumococci and their products
J.Exper.Med.51,441
- 47 Kesztyüs, L. u.
V. Vartérész (1945): Die Antigeneigenschaften des Myoglobins
Zschr.Immunit.forsch.105,372
- 48 Kingsley, S.R. (1940): A rapid method for the separation of serum albumin and globulin
J.Biol.Chem.133,731
- 49 Koltay, M. (1960): Über die Immunoelktrophorese
Orvosi Hetilap 101,1297
- 50 Korngold, L. u.
G. van Leeuwen (1959): The formation of multiple zones of precipitate by one antigen: An immunological Explanation
Internat.Arch.Allergy 15,278
- 51 Kraus, R. (1897): Über spezifische Reactionen in keimfreien Filtraten aus Cholera Typhus und Pestbouillon-culturen, erzeugt durch homologes Serum
Wien.klin.Wschr.18,736
- 52 Laurent, T. u.
J.Killander (1964): Eine Theorie der Gelfiltration und ihre experimentelle Bestätigung
J.Chromatog. 14, 317
- 53 Leskowitz, S. (1963): Immunochemical study of rabbit-globulin allotypes
J.Immunol.90,98
- 54 Lowry, O.H.,
N.V. Rosebrough,
A.L. Farr u.
R.J. Randall (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent
J.Biol.Chem.193,265
- 55 Mandeles, S. (1960): Use of DEAE-cellulose in the separation of proteins from egg white and other biological materials
J.Chromatog.2,56
- 56 Manteufel, P. u.
H. Beger (1921): Untersuchungen über unspezifische Reaktionen bei präzipitierenden Antiseren
Zschr.Immunit.forsch.33,348

- 57 Manteufel, P. u.
Y. Tomioka (1924): Über die Benutzung von Fleisch
an Stelle von Serum als Antigen
bei der Herstellung von präzipitieren-
den Antiseren für die biologische
Lebensmitteluntersuchung
Zbl.Bakt.I Orig. 91, 317
- 58 Maurer, P. (1962): Antigenicity of polypeptides
(Poly- -amino-acids)
J.Immunol.88, 330
- 59 Mc Meekin, T.L. (1940): Preparation and properties of serum
and plasma proteins
J.Amer.Chem.Soc.62, 3393
- 60 Meyer, K. u.
H. Weber (1933): Das kolloidale Verhalten der
Muskeleiweißkörper
Biochem.Zschr.266, 137
- 61 Nazareth, G.,
M. Takashi u.
R.C. Rachel (1962): Analysis of immune precipitates
by serum-agar-diffusion
J.Immunol. 88, 426
- 62 Nötel (1902): Ein Verfahren zum Nachweis von
Pferdefleisch
Zschr.Hyg.39, 373
- 63 Nultsch, W. (1962): Separation of chromoproteids by
gel filtration
Biochim.biophysica acta 59, 213
- 64 Okata, T.S. u.
A.G. Sato (1963): Procedure of a highly tissue-speci-
fic antiserum against a particular
sub-fraction separated from kidney
microsoms
Nature 197, 1216
- 65 Ouchterlony, Ö.(1949): Antigen-antibody reaction in gel
Acta path.microbiol.Scand.26, 507
- 66 Oudin, J. (1946): Methode, d'analyse immunochimique
par précipitation spécifique en
milieu gelifié
Compt.rend.Acad.sc.222, 115
- 67 Peetom, F. (1963): The agar precipitation technique
and its application as a diagnostic
and analytical method
Oliver u. Boyd, Edinburgh u.London

- 68 Perry, S.V. u.
M. Zydowo (1959): The nature of the extra protein
fraction from myofibrils of striated
muscle
Biochem.J.71, 220
- 69 Petersen, K.O. (1945): Ultracentrifugal studies on serum
and serum fractions
zit.n.Huppe-Seyler u.F.H. Thierfelder,
Bd.4,T.1,S.232; 44
- 70 Peterson, E. u.
H.A. Sober (1954): Chromatography for serum on cellulose
ion exchangers
Fed.Proc.13, 273
- 71 Pike, R.M. u.
S.E. Sulkin (1957): The agar diffusion precipitin test
as a method of recording evidence
of meat adulting
J.Laborat.Clin.Med.49, 657
- 72 Porath, J. u.
P. Flodin (1963): Gel filtration
Proteides of the biological Fluids
10, 290
- 73 Quinn, J.R.,
A.M. Pearson u.
J.R. Brunner (1964): Detection and isolation of multiple
myoglobins from beef muscle
J.Food Sc.29, 422
- 74 Dieselben (1964): Charakterization studies of three
myoglobin fractions from bovine muscle
J.Food Sc.29, 429
- 75 Ramon, G. (1922): Sur une technique de titrage in vitro
du sérum antidiphthérique
Compt.rend.Soc.biol.86, 711
- 76 Ramon, G. u.
E. Lemétayer (1931): A propos de l'augmentation de
production de l'antitoxine tetanique
Compt.rend.Soc.biol.106, 71
- 77 Rein, H. u.
M. Schneider (1955): Physiologie des Menschen
Springer, Berlin, Göttingen,
Heidelberg
- 78 Rhodes, M.,
B. Parviz, R.Azari u.
R.E. Feeney (1958): Analysis, Fractionation and Purifi-
cation of egg white proteins with
cellulosecation exchanger
J.Biol.Chem.230, 399
- 79 Rosenberg, R. (1928): Eine Methode der präzipitatorischen
Eiweißdifferenzierung
Zbl.Bakt.I Orig.107, 448

- 80 Roulet, D.L.A.,
E. Gugler, S. Rosin,
N. Renaud u.
A. Hässig (1960): Untersuchung über die Antigenstruktur menschlicher Serumproteine
Vox sanguinis 2, 479
- 81 Roulet, D.L.A.,
M. Bein u.
G.v. Muralt (1961): Immunelektrophoretische Untersuchungen an Kuhmilchpräparaten
Milchwiss. 16, 415
- 82 Ruckli, A. (1962): Subcutane Anwendung von Freund'schem Adjuvans
Path. Microbiol. 25, 257
- 83 Ruppin, E. (1902): Zum Nachweis von Pferdefleisch
Zschr. Untersuch. Nahrungsmitt. 2, 395
- 84 Salobir, K. (1956): Papierelektrophoretische Untersuchung der Muskeleiweiß-Körper von Schweinen bei biologisch hochwertiger Kost und Eiweißmangelernährung
Vet.-med. Diss., Hannover
- 85 Scheibner, G. (1960): Serologische Eiweißdifferenzierung mittels Präzipitation im Agar-Gel
Mhefte Vet. med. 15, 314
- 86 Scheidegger, J.J. (1955): Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse
Internat. Arch. Allergy 7, 103
- 87 Schmidt, W.A. (1907): Untersuchung über die Erzeugung hochwertiger Muskeleiweiß-Antisera für die Fleischedifferenzierung
Biochem. Zschr. 5, 492
- 88 Derselbe (1908): Studien über Präzipitinreaktion und erhitzte Eiweißstoffe
Biochem. Zschr. 14, 294
- 89 Derselbe (1912): Über ein Präzipitin, welches es ermöglicht auch gekochtes (unlösliches) Eiweiß zu differenzieren
Biochem. Zschr. 13, 166
- 90 Schmidt, H. (1955): Fortschritte der Serologie
2. Aufl., Steinkopff, Darmstadt
- 91 Schober, R. u.
N. Heimbürger (1960): Charakterisierung von Labpräparaten verschiedener Reinheitsgrade durch die Immunelektrophorese
Milchwiss. 15, 561

- 92 Schoop, G. u.
G. Wachendörfer (1963): Die Diagnose der klassischen
Schweinepest mit Hilfe des Agargel-
verfahrens
Mhefte Tierhk. 15, 164
- 93 Schwick, G. u.
K. Störiko (1964): Qualitative und quantitative Plasma-
proteinbestimmung durch Immunprä-
zipitate
Laboratoriums-Blätter Behring-Werke,
Ausgabe Mai
- 94 Schwick, G. (1958): Die Technik der Immuno-Elektropho-
rese
Laboratoriums-Blätter Behring-Werke,
Ausgabe Februar
- 95 Seegal, D. u.
The formation of precipitin für the
group a specific carbohydrate of
streptococcus hemolyticus in rabbits
injected intravenously and subcu-
taneously
J. Immunol. 27, 211
- 96 Sinell, H.-J. (1961): Versuche zum biologischen Nachweis
hitzedenaturierter Muskelproteine
Zbl. Vet. med. 8, 57
- 97 Smith (1951): zit. nach Bosch, M.W. (9)
- 98 Tchistowitch, Th.
(1899): Sur l'immunisation contre le sérum
d'anguilles
Ann. Inst. Pasteur, Paris 13, 406
- 99 Treffers, H.P.,
M. Heidelberger u.
J. Freund (1947): Antiproteins in horse sera
J. Exper. Med. 86, 83
- 100 Tsukasaki, R. (1922): On the alcoholprecipitate of serum
as antigen
Tohoku J. Exper. Med. 3, 653;
zit. n. Manteufel, P. Y. Tomioka (57)
- 101 Uhlenhuth, P. (1901): Untersuchung des Fleisches ver-
schiedener Tiere mit Hilfe speziel-
ler Sera und die praktische Anwen-
dung der Methode in der Fleischbe-
schau
Dtsch. med. Wschr. 27, 780
- 102 Derselbe (1903): in: Sitzung des Medizinischen
Vereins in Greifswald, 6.12.1902,
Zif. 2
Dt. Med. Wschr. 19, Vereinsbeilage 39

- 103 Uhlenhuth, P. u.
O. Weidanz (1905): Das biologische Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von Menschen- und Tierblut sowie anderer Eiweißsubstanzen und seine Anwendung in der forensischen Praxis
G.Fischer, Jena
- 104 Uhlenhuth, P. u.
W.Seiffert (1930): Die biologische Eiweißdifferenzierung mittels Präzipitation in: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen
Hrsg.v. W.Kolle, R.Kraus, P.Uhlenhuth, Bd.3,1. S.365
G.Fischer, Jena
- 105 Uriel, J. u.
P.Grabar (1956): Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique en milieu gelifié
Ann.Inst.Pasteur, Paris 90, 427
- 106 Vaerman, J.-P.,
J.F. Hereman u.
C. Vaerman (1962): Studies of the immune globulins of human serum
J.Immunol.91, 7
- 107 Vorlaender, K.O. u.
J. Ross (1961): Die Agar-Gel Diffusionstechnik in der Immunologie klinischer Erkrankungen
Klin.Wschr.39, 605
- 108 Wachendörfer, G.
(1964): Das Agar-Präzipitationsverfahren bei der Entenhepatitis, der Newcastle-Krankheit und besonders der klassischen Schweinepest. Seine Leistungsfähigkeit und Grenzen in der Virusdiagnostik.
Vortrag auf der Tagung der Wiss.Ges. Vet.med., Jena, 11. u. 12.9.64
- 109 Wachs, W. (1961): Öle und Fette
T. 1, Hayn, Berlin
- 110 Wadsworth, C. (1957): A slide microtechnique for the analysis of immune precipitate in gel
Internat.Arch.Allergy 10, 355
- 111 Weber, H.H. u.
R. Stöver (1933): Das kolloidale Verhalten der Muskel-eiweißkörper
Biochem.Zschr.259, 269
- 112 Weigle, O. u.
J. Mc Conahey (1962): The serologic cross-reaction between bovine serum albumin and anti-ovalbumin
J.Immunol.88, 121

- 113 Whitaker, J.R. (1950): Determination of molecular weight of proteins by gel filtration on SEPIADEX
Analyt.Chem. 25, 1950
- 114 Williams, C.A. u.
P. Grabar (1953): Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétique et immunochimique d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin
Biochim.biophysica acta 10, 193

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. H.-J. SINELL, möchte ich am Schluß meiner Arbeit für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte großzügige Unterstützung aufrichtig danken.

Herzlich danken möchte ich auch Fräulein Inge Mentz, die mir in steter Hilfsbereitschaft zahlreiche technische Hinweise gegeben hat.

Lebenslauf

Am 24. 9. 1938 wurde ich, Ursula Barten, als Tochter des Dr. med. Heinz Barten und seiner Ehefrau Gerda, geb. Neumann in Vetschau geboren.

Von 1945 bis 1953 besuchte ich die Zentralschule in Vetschau und legte im Jahre 1957 an der Oberschule in Calau die Reifeprüfung ab.

An der Askanischen Schule in Berlin-Tempelhof absolvierte ich 1958 das Ergänzungsabitur und wurde im gleichen Jahre an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Dort bestand ich 1960 die tierärztliche Vorprüfung und legte 1963 das tierärztliche Staatsexamen ab.

Meine Veterinärpraktikantenzeit absolvierte ich an der Klinik für Kleine Haustiere und Klinik für Tiergeburtshilfe und Fortpflanzungskrankheiten der Freien Universität Berlin und erhielt am 4. 12. 1964 die Approbation.

